



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Leptospirose e Fasciolose: interações imunológicas  
no polimorfismo do quadro clínico de doentes de  
São Miguel (Açores)

**Vanessa Sophia Saavedra Azevedo**

**Fevereiro, 2013**



**Universidade Nova de Lisboa**  
**Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Leptospirose e Fasciolose: interações imunológicas  
no polimorfismo do quadro clínico de doentes de  
São Miguel (Açores)

**Vanessa Sophia Saavedra Azevedo**

**Orientadora:** Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira

**Co-Orientadora:** Investigadora Doutora Ana Júlia Afonso

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM  
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**Fevereiro, 2013**

***Aos meus pais***

*Os meus pilares na vida, que me acompanharam nesta viagem, contribuindo com a sua paciência, interesse, incentivo, apoio incondicional, companheirismo, dedicação, carinho e alegria de viver, aconselhando-me em todos os momentos necessários e confiando nas minhas escolhas e no meu futuro!*

*“O proveito do nosso estudo é o de, com ele, nos termos tornado melhores e mais sábios”*

Michel de Montaigne

## AGRADECIMENTOS

Quero apresentar a minha gratidão para com as pessoas próximas de mim. Sem o seu apoio e colaboração, nunca teria conseguido realizar este trabalho, pois auxiliaram-me no crescimento e amadurecimento pessoal, intelectual e profissional. Por tudo, quero aqui deixar o meu MUITO OBRIGADA...

À minha orientadora, Investigadora Doutora Maria Luísa Vieira, a quem agradeço a amizade, a força e a confiança, e ainda o privilégio de me ter ensinado e demonstrado entusiasticamente o seu vasto conhecimento científico sobre leptospirosas. Sou muito grata pela oportunidade que me proporcionou na apresentação oral de parte deste trabalho no Congresso Europeu de Leptospirose “Eurolepto2012”, realizado em Dubrovnik, Croácia. Reconheço também o preponderante papel que teve na realização desta dissertação, pois o seu apoio, dedicação e orientação permitiram levar este trabalho a “bom porto”. Gostaria ainda de lhe agradecer as suas apreciações e opiniões, muito importantes na análise crítica e rigorosa que exerceu sobre o texto.

À minha co-orientadora, Investigadora Doutora Ana Afonso, a quem sou grata pela simpatia e amizade que sempre me demonstrou, além da força, incentivo, confiança e apoio constante para atingir os meus diversos objetivos. Agradeço-lhe pelas sugestões, indicações e conselhos disponibilizados no decurso da realização do trabalho, bem como pela análise crítica da minha dissertação.

À Professora Doutora Silvana Belo, que, como Diretora da Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica, possibilitou a minha integração no Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, acolhendo-me com grande simpatia. Agradeço pelo valiosíssimo tempo que disponibilizou para me ajudar na análise estatística e científica do trabalho, e da dissertação, e no esclarecimento das minhas dúvidas e questões, além das sugestões e correções que realizou.

À Professora Doutora Luzia Gonçalves, exprimo o meu agradecimento pela simpatia e ajuda disponibilizada, e ainda pelo apoio no tratamento estatístico dos dados deste trabalho.

À Técnica Especialista Isabel Clemente, que demonstrou uma grande simpatia e amizade, incentivando e apoiando a realização deste trabalho. Ainda despendeu do seu tempo para a transmissão de ensinamentos nas diversas técnicas utilizadas neste estudo, auxiliando na execução das mesmas.

Ao Doutor Pedro Ferreira e ao Mestrando Tiago Mendes, pelo espírito de equipa e pela generosidade na cedência de fotografias do hospedeiro intermediário de *F. hepatica*.

À restante equipa do Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas, Professoras Doutora Manuela Calado e Isabel Maurício, Mestre Cátia Ferreira e Mestranda Idalécia Moiane, que mostraram sempre grande união, transmitindo-me coragem para a realização de todos os meus projetos.

À Mestre Teresa Carreira (Técnica Superior de Laboratório), do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme, agradeço a simpatia, amizade e companheirismo demonstrados. Agradeço-lhe igualmente os ensinamentos laboratoriais da técnica para o imunodiagnóstico da leptospirose e ainda o profissionalismo na ajuda, sempre que esta foi precisa, em todos os aspetos do trabalho laboratorial e da dissertação.

À Mestre Mónica Nunes, do mesmo Grupo, pela afeição demonstrada e ajuda prestada, sempre que solicitada. Ainda um “Especial Obrigado” pelo apoio e ajuda na realização e treino da minha apresentação aquando do Congresso Eurolepto2012, bem como pela companhia na viagem e permanência na Croácia.

À restante equipa do Grupo de Leptospirose e Borreliose de Lyme (Céu Mateus, Assistente Operacional de Laboratório, Mestre Joana Garcia, Mestranda Rosa Silva e Sofia Faria e Doutoranda Elsa Fortes), pelo espírito de camaradagem e apoio em todos os momentos.

A todos os que possa ter omitido por lapso.

Aos meus amigos, em particular Marta Olias, Andreia Esteves, Luísa Barros e Ana Lúcia Pacheco, pela presença constante na minha vida, nos bons e nos maus momentos, dando-me a força necessária para a realização deste trabalho e de todos os meus objetivos.

E à minha restante Família, pelo apoio incondicional.

## RESUMO

### Leptospirose e Fasciolose: interações imunológicas no polimorfismo do quadro clínico de doentes de São Miguel (Açores)

Vanessa Sophia Saavedra Azevedo

PALAVRAS-CHAVE: Leptospirose, Fasciolose, Quadro Clínico, São Miguel (Açores)

O arquipélago dos Açores apresenta nove ilhas vulcânicas, sendo São Miguel a maior e mais populosa. Nesta região insular portuguesa, a Leptospirose é uma zoonose endémica, que afeta acidentalmente o Homem por contacto direto ou indireto com leptospiras patogénicas. Clinicamente, esta patologia apresenta diversos sintomas que podem ser semelhantes a uma gripe ou evoluir até um quadro fulminante, daí a necessidade de um diagnóstico preciso com confirmação laboratorial. A Fasciolose é outra importante doença zoonótica nos Açores que tem sido descrita como endémica neste arquipélago, causada pelo parasita *Fasciola hepatica*. A infeção humana pode ocorrer devido ao consumo de vegetais e/ou águas contaminados. O diagnóstico não é fácil, pois a infeção pelo parasita pode apresentar uma larga variedade de quadros clínicos.

O objetivo deste estudo é contribuir para a clarificação de uma possível interação imunológica, ao nível da resposta humoral observada em indivíduos com diagnóstico clínico de Leptospirose e/ou Fasciolose, em pacientes da ilha de São Miguel que apresentam um quadro clínico e epidemiológico comum a ambas as patologias, contribuindo para um melhor diagnóstico diferencial.

A amostra utilizada no estudo é composta por 280 soros de indivíduos residentes na ilha de São Miguel, que foram analisados entre 2005 e 2010 pela TAM (Técnica de Aglutinação Microscópica), para deteção de aglutininas anti-*Leptospira interrogans* s.l.. Nas amostras de soro com resultado positivo e inconclusivo pela TAM foi aplicada a técnica de rastreio micro-ELISA para o estudo da Fasciolose. Aplicou-se ainda a técnica de Imunoeletrodiffusão (IED), como técnica confirmatória, nos soros com resultado positivo e em alguns inconclusivos (n=118) para a técnica micro-ELISA.

Os resultados da TAM, previamente conhecidos, para o total de indivíduos estudados foram os seguintes: 124 (44,3%) negativos, 73 (26,1%) inconclusivos e 83 (29,6%) positivos. Estes soros foram submetidos ao teste micro-ELISA, tendo-se obtido 31,1% (n=87) resultados positivos, 31,4% (n=88) resultados inconclusivos e 37,5% (n=105) com resultado negativo para Fasciolose. Foram analisados os inquéritos clínico-epidemiológicos estabelecido para o estudo da Leptospirose humana em São Miguel para as amostras anteriormente referidas, verificando-se que os homens lavradores em idade ativa são o grupo com mais casos positivos para ambas as patologias. Além disso, os sinais e sintomas mais comuns nos doentes com resultado positivo para as duas doenças são semelhantes aos de uma gripe, e analiticamente foi notório que as transaminases, a FA/ $\gamma$ GT (apenas nos doentes com Leptospirose) e a leucocitose tinham níveis elevados. Os resultados revelaram uma provável coinfeção em 36 doentes. A técnica de IED foi positiva em 28 amostras de soro, sendo que cinco tiveram resultado positivo para as três técnicas utilizadas.

Estes resultados são promissores, demonstrando uma possível relação entre Leptospirose e Fasciolose, sendo que os respetivos agentes etiológicos partilham nichos ecológicos, o que justifica igualmente algumas semelhanças nos aspetos sociodemográficos e clínico-epidemiológicos na população afetada.

## ABSTRACT

### **Leptospirosis and Fascioliasis: immunological interactions in the clinical polymorphism of patients from São Miguel (Azores)**

**Vanessa Sophia Saavedra Azevedo**

**KEYWORDS:** Leptospirosis, Fascioliasis, Clinical manifestations, São Miguel Island (Azores).

The Azores archipelago features nine volcanic islands, São Miguel is the largest and most populous. In this Portuguese region, Leptospirosis is a endemic zoonosis, affecting man accidentally by direct or indirect contact with pathogenic leptospires. Clinically, this disease has many symptoms that can be similar to influenza like or evolved into a fulminant death thereof the need for an accurate diagnosis with laboratory confirmation. The Fascioliasis is another important zoonotic disease in the Azores, which has been described as being endemic to this archipelago caused by the parasite *Fasciola hepatica*. The human infection can occur due to consumption of contaminated vegetables and/or water. The diagnosis is not easy, since infection by the parasite may have a wide variety of clinical conditions.

The objective of this study is to contribute to the clarification of a possible interaction at the immunological humoral response observed in subjects with a clinical diagnosis of Leptospirosis and/or Fasciolosis in patients from São Miguel Island and presenting a clinical and epidemiological condition common to both pathologies, contributing to a better differential diagnosis.

The sample used in this study consists of 280 sera from individuals living on São Miguel Island, which were analyzed between 2005 and 2010 by MAT (Microscopic Agglutination Technique) for detection of anti-*Leptospira interrogans* s.l. agglutinins. The Serum samples which were positive and inconclusive by TAM were applied with the screening technique micro-ELISA for the study of Fascioliasis. Also it was applied the Imunoelectrodiffusion technique (IED) as a confirmatory technique in positive and some inconclusive sera (n=118) for micro-ELISA technique.

The results of TAM, previously known for the total subjects studied were: 124 (44.3%) negative, 73 (26.1%) inconclusive and 83 (29.6%) positive. These sera were tested by micro-ELISA thereby obtaining 31.1% (n = 87) positive results, 31.4% (n=88) inconclusive results and 37.5% (n=105) with a negative results for Fasciolosis. We analyzed the clinical-epidemiological surveys established for the study of human Leptospirosis in São Miguel Island, for the mentioned samples above, verifying that men, farmers in the active age group have the most positive cases for both diseases. Furthermore, the most common signs and symptoms in patients with positive results for both diseases are similar to the flu and analytically it was notorious that transaminases, FA/ $\gamma$ GT (only in patients with Leptospirosis) and leukocytosis had elevated levels. The results revealed a probable co-infection in 36 patients. The technique of IED was positive in 28 serum samples, in which five sera were positive for the three techniques.

These results are promising, showing a possible relationship between Leptospirosis and Fasciolosis whereas the respective etiologic agents share ecological niches which justify also some similarities in sociodemographic and clinical-epidemiological aspects in the affected population.

# ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE GERAL .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
<b>PARTE I – Introdução à Leptospirose e à Fasciolose .....</b>	<b>1</b>
<b>1. OBJETIVO DO ESTUDO E JUSTIFICAÇÃO DO TEMA .....</b>	<b>2</b>
1.1. Objetivos gerais do estudo .....	3
1.2. Justificação do tema .....	3
<b>2. LEPTOSPIROSE .....</b>	<b>5</b>
2.1. Dados históricos relevantes .....	6
2.2. Epidemiologia .....	7
2.2.1. Distribuição mundial .....	8
2.2.2. Situação em Portugal (área endémica – Açores) .....	9
2.3. Agente etiológico – <i>Leptospira interrogans</i> sensu lato .....	10
2.3.1. Caracterização do agente etiológico .....	10
2.3.2. Taxonomia .....	12
2.3.2.1. Classificação fenotípica e genotípica .....	12
2.3.3. Ciclo silvático .....	13
2.3.3.1. Reservatórios/hospedeiros .....	14
2.3.3.2. Modo de transmissão .....	15
2.3.4. Ecologia .....	16
2.4. Manifestações clínicas .....	16
2.4.1. Forma anictérica e ictérica .....	17
2.5. Diagnóstico laboratorial .....	17
2.5.1. Métodos diretos .....	18
2.5.1.1. Microscopia de fundo escuro .....	18



2.5.1.2. Detecção de ADN leptospírico .....	19
2.5.2. Métodos indiretos .....	19
2.5.2.1. Técnica de aglutinação macroscópica (MACROLepto – Técnica de Rastreio) .....	19
2.5.2.2. Técnica Elisa .....	20
2.5.2.3. Técnica de aglutinação microscópica (TAM – Técnica de Referência) .....	21
2.6. Tratamento, prevenção e controlo .....	21
<b>3. FASCIIOLOSE .....</b>	<b>23</b>
3.1. Dados históricos relevantes .....	24
3.2. Epidemiologia .....	24
3.2.1. Distribuição mundial .....	26
3.2.2. Situação em Portugal (área endémica – Açores) .....	27
3.3. Agente etiológico – <i>Fasciola hepatica</i> .....	28
3.3.1. Caracterização do agente etiológico .....	29
3.3.2. Taxonomia .....	31
3.3.3. Ciclo silvático da espécie .....	32
3.3.3.1. Ciclo de vida .....	32
3.3.3.2. Modo de transmissão .....	33
3.3.3.3. Hospedeiros definitivos .....	34
3.3.3.4. Hospedeiros intermediários .....	35
3.3.3.5. Ecologia .....	36
3.3.4. Interações parasita-hospedeiro .....	37
3.4. Manifestações clínicas .....	38
3.5. Diagnóstico laboratorial .....	39
3.5.1. Diagnóstico diferencial entre duas espécies .....	40
3.5.2. Testes serológicos .....	41
3.6. Tratamento, prevenção e controlo .....	42
 <b>PARTE II – Interações imunológicas no polimorfismo do quadro clínico de doentes de São Miguel (Açores) .....</b>	 <b>44</b>
<b>1. INTRODUÇÃO AO ESTUDO .....</b>	<b>45</b>

<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	47
2.1. População-alvo e critérios de inclusão	48
2.1.1. Antígenos ( <i>Fasciola hepatica</i> )	48
2.2. Métodos	49
2.2.1. Pesquisa de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos – micro-ELISA	49
2.2.2. Pesquisa de anticorpos e antígenos por Imunoelectrodifusão – IED	54
2.2.3. Análise Estatística	57
<b>3. RESULTADOS</b>	59
3.1. Comparação sociodemográfica e clínico-epidemiológica da amostra populacional <i>versus</i> resultados da TAM	60
3.2. Comparação sociodemográfica e clínico-epidemiológica da amostra populacional <i>versus</i> resultados da micro-ELISA	65
3.3. Tratamento estatístico dos resultados obtidos pela técnica micro-ELISA	71
3.4. Avaliação dos soros pelo método imunológico Imunoelectrodifusão – IED	73
<b>4. DISCUSSÃO</b>	75
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	81
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	83
<b>7. ANEXO 1</b>	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura I 2.1. Distribuição mundial de Leptospirose .....	8
Figura I 2.2. Microfotografia eletrónica de <i>Leptospira</i> spp .....	10
Figura I 2.3. Esquematização da morfologia de <i>Leptospira</i> spp em corte transversal .....	11
Figura I 2.4. Taxonomia de <i>Leptospira</i> spp .....	12
Figura I 2.5. Ciclo de transmissão das leptospirosas .....	14
Figura I 2.6. Imagem de microscopia de fundo escuro com bactérias do género <i>Leptospira</i> .....	18
Figura I 3.1. Distribuição mundial de parasitas do género <i>Fasciola</i> spp .....	26
Figura I 3.2. Distribuição geográfica do hospedeiro intermediário <i>Lymnaea truncatula</i> na ilha de São Miguel .....	28
Figura I 3.3. Imagem do parasita <i>Fasciola hepatica</i> .....	30
Figura I 3.4. <b>A-</b> Ovo de <i>Fasciola hepatica</i> a 40x; <b>B-</b> Cercária de <i>Fasciola hepatica</i> ..	30
Figura I 3.5. Taxonomia de <i>Fasciola hepatica</i> .....	31
Figura I 3.6. Ciclo de vida de <i>Fasciola hepatica</i> .....	33
Figura I 3.7. Hospedeiros definitivos de <i>Fasciola</i> spp: produção pecuária (A-C), não-domésticos (D-G) e alguns selvagens (G-N). <b>A-</b> bovinos; <b>B-</b> ovinos; <b>C-</b> caprinos; <b>D-</b> burros; <b>E-</b> mulas; <b>F-</b> cavalos; <b>G-</b> camelos; <b>H-</b> búfalos; <b>I-</b> veados; <b>J-</b> alces; <b>L-</b> javalis; <b>M-</b> coelhos; <b>N-</b> ratos .....	35
Figura I 3.8. <i>Lymnaea truncatula</i> , hospedeiro intermediário de <i>Fasciola hepatica</i> .....	36
Figura II 2.1. Representação esquemática da técnica micro-ELISA .....	50
Figura II 2.2. Esquema representativo de uma microplaca.....	51
Figura II 2.3. Imagem representativa da migração do soro-antigénio na técnica IED ..	54
Figura II 3.1. <b>A-</b> Distribuição etária dos doentes de acordo com sintomatologia compatível com Leptospirose; <b>B-</b> Resultados obtidos pela TAM <i>versus</i> faixa etária .....	60

Figura II 3.2. <b>A-</b> Distribuição do género da amostra populacional; <b>B-</b> Resultados obtidos pela TAM <i>versus</i> género .....	61
Figura II 3.3. Doentes analisados pela técnica micro-ELISA (antigénio deslipidizado <i>versus</i> total), com anticorpos IgM e IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> .....	65
Figura II 3.4. Distribuição dos doentes por grupo etário <i>versus</i> resultados obtidos pela técnica micro-ELISA .....	67
Figura II 3.5. Representação gráfica da serorreatividade pela técnica micro-ELISA de acordo com o género .....	67
Figura II 3.6. Diagrama de extremos e quartis das densidades óticas dos anticorpos anti- <i>Fasciola hepatica</i> <i>versus</i> resultados da TAM no antigénio total (AgT) e no deslipidizado (AgD), com presença dos candidatos a valores desviantes ( <i>outliers</i> ) moderados (o) e severos (★). <b>A-</b> Resultado obtido com AgT para IgM e IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> ; <b>B-</b> Resultado obtido com AgD para IgM e IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> *Existência de diferenças significativas; ** Ausência de diferenças significativas .....	72
Figura II 3.7. Representação gráfica da comparação múltipla dos resultados obtidos pela TAM através dos valores de densidades óticas obtidas (micro-ELISA). <b>A-</b> Anticorpo IgM anti- <i>Fasciola hepatica</i> para o AgT; <b>B-</b> Anticorpo IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> para o AgT; <b>C-</b> Anticorpo IgG anti- <i>Fasciola hepatica</i> para o AgD .....	73
Figura II 3.8. Resultados obtidos na IED. <b>A-</b> Resultado positivo; <b>B-</b> Resultado negativo .....	73
Figura II 3.9. Representação gráfica dos resultados obtidos na IED .....	74
Figura II 7.1. Inquérito epidemiológico existente na ilha de São Miguel para a análise da Leptospirose.....	100

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição dos doentes/soros <i>versus</i> diagnóstico laboratorial para Leptospirose (TAM) .....	48
Tabela 2. Reagentes para a preparação da Solução Tampão Carbonato .....	50
Tabela 3. Reagentes para a preparação da Solução <i>stock</i> Tampão Fosfato 0,5M, Soro Fisiológico 9‰ e Solução Tampão PBS/Tween® 0,05% .....	51
Tabela 4. Reagentes para a preparação da Solução Albumina Bovina 2% .....	52
Tabela 5. Reagentes para a preparação da Solução Tampão Substrato .....	53
Tabela 6. Reagentes para a preparação da Solução Tampão Veronal .....	55
Tabela 7. Reagentes para a preparação da Solução Citrato de Sódio 5% .....	56
Tabela 8. Reagentes para a preparação da Solução negro de amido .....	56
Tabela 9. Reagentes para a preparação da Solução descorante do negro de amido .....	57
Tabela 10. Distribuição dos doentes com suspeita/confirmação de Leptospirose por profissão/ocupação .....	61
Tabela 11. Distribuição do número de doentes pelas fontes de transmissão <i>versus</i> resultados da TAM .....	62
Tabela 12. Sinais e sintomas clínicos compatíveis com Leptospirose <i>versus</i> resultados da TAM .....	63
Tabela 13. Comparação entre a avaliação da primeira amostra pela TAM (Leptospirose) <i>versus</i> teste de rastreio (micro-ELISA) para Fasciolose ....	66
Tabela 14. Distribuição dos doentes avaliados pela técnica micro-ELISA de acordo com a profissão/ocupação .....	68
Tabela 15. Distribuição dos doentes de acordo com as fontes de transmissão mais frequentes para Fasciolose .....	68
Tabela 16. Manifestações/quadro clínico <i>versus</i> resultados da técnica micro-ELISA ..	69
Tabela 17. Níveis séricos dos anticorpos anti- <i>Fasciola hepatica</i> (IgM e IgG) observados nos soros previamente avaliados pela TAM .....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ADNr</b>	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
<b>AgD</b>	Antigénio Deslipidizado
<b>AgT</b>	Antigénio Total
<b>ARNr</b>	Ácido Ribonucleico Ribossomal
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>CAAT</b>	<i>Cross Agglutination Absorption Test</i>
<b>CEP</b>	<i>Counter-Electrophoresis</i>
<b>DDO</b>	Doença de Declaração Obrigatória
<b>DGS</b>	Direção-Geral de Saúde
<b>Dot-blot</b>	<i>Dot-immunoblotting</i>
<b>ES</b>	Excreção-Secreção
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>FA/<math>\gamma</math>GT</b>	Fosfatase Alcalina / Gama Glutamyltransferase
<b>FAST</b>	<i>Falcon Assay Screening Test</i>
<b>g</b>	Gramma
<b>GH&amp;MM</b>	Grupo de Helminologia e Malacologia Médica
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HDESPD</b>	Hospital do Divino Espírito Santo em Ponta Delgada
<b>H<sub>2</sub>O d.</b>	Água Destilada
<b>IED</b>	Imunoeletrodifusão
<b>IFAT</b>	<i>Indirect Fluorescent Antibody Test</i>
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G

<b>IgM</b>	Imunoglobulina da classe M
<b>IHA</b>	<i>Indirect Hemagglutination Assay</i>
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística
<b>IP</b>	<i>Immunoperoxidase</i>
<b>ITS-1</b>	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
<b>ITS-2</b>	<i>Internal transcribed spacer 2</i>
<b>K</b>	Testes estatísticos
<b>Kb</b>	Quilobase
<b>km</b>	Quilómetro
<b>km<sup>2</sup></b>	Quilómetro Quadrado
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>M</b>	Molar
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µm</b>	Micrómetro
<b>µg/P/ml</b>	Micrograma de Proteína por Mililitro
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N</b>	Normal
<b>n.º</b>	Número
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaCO<sub>3</sub></b>	Carbonato de Sódio
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de Sódio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de Sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato Dissódico

<b>NC</b>	Inconclusivo
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>P</b>	<i>Value-p</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>pH</b>	<i>Potential of Hydrogen</i>
<b>RAPD</b>	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
<b>RFLP</b>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<b>SD</b>	<i>Standard- Deviation</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
<b>s.l.</b>	sensu lato
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>SSCP</b>	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
<b>TAM</b>	Técnica de Aglutinação Microscópica
<b>TGO/TGP</b>	Transaminase Glutâmico-Oxalacética / Transaminase Glutâmico Pirúvica
<b>Th1</b>	<i>T helper cell 1</i>
<b>Th2</b>	<i>T helper cell 2</i>
<b>UEIPM</b>	Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica
<b>UNL</b>	Universidade Nova de Lisboa
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>
<b>V</b>	Volte
<b>v/v</b>	volume/volume
<b><math>\alpha</math></b>	Nível de significância
<b>°C</b>	Grau Centígrado



%	Percentagem
‰	Permilagem
♀	Símbolo para o Género Feminino
♂	Símbolo para o Género Masculino
$\bar{X}$	Média das Absorvências
$\chi^2$	Qui-quadrado de Pearson

# **PARTE I – Introdução à Leptospirose e à Fasciolose**

# **1. OBJETIVO DO ESTUDO E JUSTIFICAÇÃO DO TEMA**

## 1.1 Objetivos gerais do estudo

O **objetivo geral** deste trabalho consistiu em determinar possíveis interações imunológicas da resposta humoral observada em pacientes com diagnóstico clínico de Leptospirose e/ou Fasciolose, residentes na ilha de São Miguel e que apresentavam um quadro clínico e epidemiológico comum a ambas as patologias, contribuindo deste modo para um diagnóstico diferencial.

## 1.2 Justificação do tema

A Leptospirose é uma patologia transmitida pelo agente etiológico *Leptospira interrogans*, é uma zoonose emergente com distribuição mundial que afeta essencialmente países desenvolvidos ou em desenvolvimento, com clima temperado e/ou tropical <sup>(56,108)</sup>. Os humanos são expostos a este agente patogénico através das atividades profissionais e/ou lazer que contactam direta ou indiretamente com as leptospiros através de solo ou água contaminada, animais infetados ou reservatórios (roedores), além das alterações climáticas, essencialmente nos períodos de maior intensidade de pluviosidade, proporcionando uma maior dispersão das leptospiros <sup>(56)</sup>. A sintomatologia presente nesta bacteriose é diversificada e inespecífica principalmente nos primeiros dias de infeção (a fase aguda), o que dificulta o diagnóstico clínico devido à sobreposição da sintomatologia com outras enfermidades <sup>(56)</sup>. Em Portugal, a Leptospirose é endémica particularmente nos Açores (ilhas de São Miguel e Terceira), onde, comparativamente com o continente, se verifica uma maior taxa de incidência <sup>(108)</sup>. A Fasciolose é uma parasitose animal que atinge normalmente os bovinos, caprinos e ovinos, entre outros, e acidentalmente os humanos, sendo considerada uma doença emergente/reemergente <sup>(67)</sup>. Esta doença tem uma grande distribuição mundial, principalmente devido ao helminta *F. hepatica*, que infeta os humanos através do seu comportamento, atividades e condições de habitabilidade, bem como através das alterações climáticas e ambientais <sup>(67,72)</sup>. As manifestações clínicas existentes nesta patologia conduzem, por vezes, a um diagnóstico erróneo devido à similaridade com outras doenças <sup>(67)</sup>. Em Portugal, esta helmintose encontra-se presente principalmente na região norte, centro e em algumas ilhas, de que se destaca São Miguel <sup>(72)</sup>. Contudo, nem em Portugal nem no mundo esta enfermidade é de declaração obrigatória, facto que

origina uma acrescida dificuldade na verificação da incidência mundial, sendo a Fasciolose considerada uma doença subestimada mundialmente <sup>(67)</sup>.

Ambas as patologias apresentam um quadro clínico muito polimórfico, existindo manifestações clínicas semelhantes entre as duas patologias, o que pode levar a um diagnóstico incorreto dos doentes. Em ambas as patologias é na fase inicial (aguda) que ocorre a sintomatologia mais marcada.

Na ilha de São Miguel, nos Açores, verifica-se uma concomitância e um endemismo de ambos, parasita (e respetivo hospedeiro intermediário) e bactéria, devido às características edafoclimáticas propícias que a região proporciona para a sobrevivência e dispersão das leptospiros e da fascíola. Também se verifica que existem aspetos similares no ciclo biológico de ambos, como a grande necessidade da presença de água e a existência de alguns hospedeiros comuns, os quais estão igualmente presentes na ilha de São Miguel.

A análise dos soros de indivíduos com suspeita clínica de Leptospirose oriundos da ilha de São Miguel foi realizada no Laboratório de Referência de Leptospirose, Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa (IHMT – UNL), no âmbito da respetiva prestação de serviços à comunidade para o diagnóstico laboratorial da referida doença. Neste estudo, pretendeu-se realizar uma análise imunológica nas amostras de soro anteriormente referidas e com informação clínica e epidemiológica comum quer à Leptospirose quer à Fasciolose, através de técnicas de imunodiagnóstico, de modo a verificar-se a possível existência de coinfeção por ambos os agentes infecciosos com base na respetiva resposta imune.

## **2. LEPTOSPIROSE**

## 2.1. Dados históricos relevantes

A Leptospirose humana ou doença de Weil é uma zoonose que já teve diversas denominações, como febre dos pântanos, febre dos arrozais, febre outonal, doença dos porquinhos, tifo canino, entre outras <sup>(55,56,69)</sup>. A doença de Weil é a denominação mais conhecida, atribuída geralmente à sintomatologia mais grave desta patologia. Esta designação é uma homenagem a Adolf Weil, médico alemão que, em 1886, descreveu a doença pela primeira vez num doente com icterícia, ainda hoje a forma mais grave desta zoonose <sup>(56,109,112)</sup>. Todavia, este tipo de sintomatologia já era conhecido antes daquela data, só que até então não se conhecia o agente etiológico <sup>(56)</sup>.

Por sua vez, a descrição do agente etiológico da Leptospirose só ocorreu no século XIX, inicialmente, por Stimson (1907), que lhe atribuiu a designação de *Spirochaeta interrogans*, atualmente, esta nomenclatura encontra-se parcialmente alterada <sup>(56,109)</sup>. Porém, só em 1915 dois médicos japoneses, Inada e Ido, realizaram a primeira identificação/descrição das leptospiros enquanto agentes causais da Leptospirose/doença de Weil, e, quase simultaneamente, dois outros grupos de investigadores alemães, Huebener & Reiter e Uhlenhuth & Fromme <sup>(56,109)</sup>.

Em Portugal, a Leptospirose humana foi primeiramente identificada em 1931, e desde então tem-se verificado um crescente número de casos ao longo dos anos, principalmente na região centro do país e nas ilhas, em particular no arquipélago dos Açores (particularmente nas ilhas de São Miguel e Terceira), consideradas áreas endémicas para a Leptospirose desde 1993 <sup>(24,27,45)</sup>. A investigação desta doença em Portugal teve início nos anos 40 com estudos epidemiológicos e serológicos, tendo sido considerada doença de declaração obrigatória (DDO) em 1950, para *Leptospira icterhaemorrhagiae* <sup>(107)</sup>. Contudo, só em 1987 a declaração obrigatória foi alargada a todas as suas estirpes infetantes, devido particularmente aos estudos realizados à época, nomeadamente os levados a efeito por Collares-Pereira, a partir dos anos 80, investigação desenvolvida quer no agente etiológico quer nos reservatórios do mesmo <sup>(107,108)</sup>.

## 2.2. Epidemiologia

A Leptospirose é uma zoonose emergente/reemergente que afeta a população humana que vive quer em regiões rurais quer urbanas, com crescente enfoque nestas últimas, onde constituiu um grave problema de saúde pública <sup>(69,79,109)</sup>. A população em idade ativa é a mais afetada por esta doença, devido às diversas atividades/profissões que realiza e que lhes proporciona um contacto próximo com as potenciais fontes de transmissão da bactéria, sendo geralmente atingidos os trabalhadores que contactam com coleções de água doce contaminada com leptospiras, nomeadamente os trabalhadores dos esgotos, agricultores, tratadores de gado, operários da construção civil, entre outros <sup>(36,55,69,79,96)</sup>. Além destas atividades, a falta de saneamento básico também proporciona uma fonte de infeção muito elevada para os humanos, principalmente nas zonas rurais <sup>(36)</sup>.

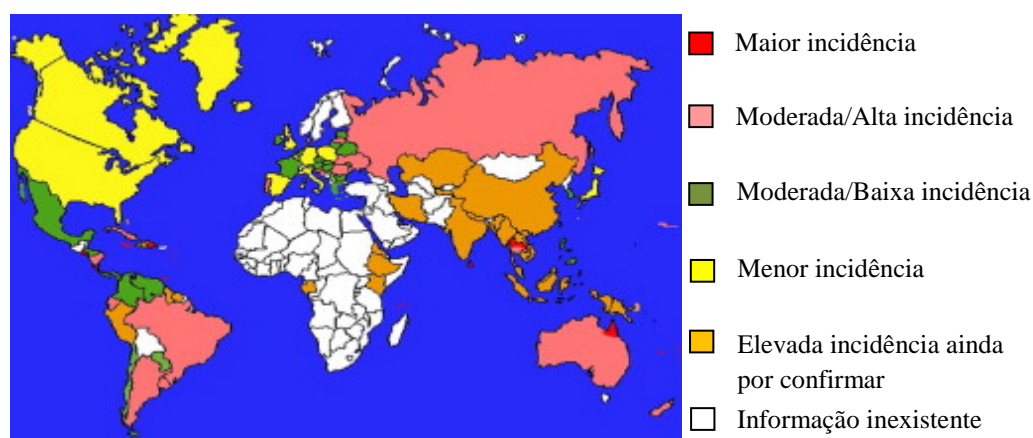
As condições climáticas existentes numa determinada área geográfica são igualmente condicionantes epidemiológicos de grande importância <sup>(44,56)</sup>. Determinadas épocas do ano propiciam uma maior frequência de casos de Leptospirose nos humanos como se verifica nas regiões temperadas, sendo que esta evidência caracteriza a patologia como dependente da sazonalidade das regiões onde ocorre <sup>(36,44,56)</sup>. Todavia, nas regiões tropicais, essa característica não se observa, devido a um clima húmido e chuvoso, contribuindo para a ocorrência de casos ao longo do ano <sup>(36,44,56)</sup>.

Na generalidade dos países, esta zoonose é de declaração obrigatória, contudo, esta notificação nem sempre é cumprida, devido sobretudo à variabilidade de quadros clínicos, que dão origem a dificuldades de diagnóstico, o que obriga a dispor de laboratórios adequados, metodologias muito específicas e pessoal muito treinado para a execução das mesmas <sup>(44,49)</sup>. Todas estas limitações condicionam o conhecimento correto da distribuição da Leptospirose no mundo, pelo que se acredita que a doença está atualmente muito subestimada <sup>(44,49)</sup>.



### 2.2.1. Distribuição mundial

A Leptospirose é uma doença com dispersão mundial, atingindo tanto os países desenvolvidos como subdesenvolvidos, com maior ênfase de incidência nos países em desenvolvimento (Figura I 2.1) <sup>(109)</sup>. Esta patologia é endêmica em diversos países do globo, entre os quais os países asiáticos (por exemplo Índia), da Oceânia e da América (Central e do Sul) <sup>(36)</sup>. Além do endemismo registado, ainda existem surtos que geralmente são provocados por desastres naturais (inundações, tempestades e furacões), sendo os países mais afetados, de acordo com registos oficiais, a Nicarágua, o Sri Lanka, as Filipinas, a Indonésia, o Brasil, a Índia, os Estados Unidos da América (Havai) e a Malásia, entre outros <sup>(36,49,56)</sup>.



**Figura I 2.1.** Distribuição mundial de Leptospirose  
(adaptado de Pappas, et al., 2008 <sup>(79)</sup>)

A nível mundial, os casos de Leptospirose humana registados apontam essencialmente para casos de elevada severidade, com uma prevalência estimada de 500 000 a 1 000 000 de casos por ano, admitindo-se, no entanto, que este valor esteja subestimado <sup>(34,43)</sup>. Além da referida incidência, a mortalidade nestes casos é bastante elevada, atingindo os 10% de casos, sendo por vezes até superior <sup>(43,82)</sup>.

A incidência da Leptospirose humana é variável, porém estima-se que esse valor compreenda 10 a 100 casos por 100 000 habitantes <sup>(36,49)</sup>. Quando o número de casos é superior a 100 no mesmo número de habitantes, considera-se a ocorrência de uma epidemia <sup>(49)</sup>. Em regiões endémicas de clima temperado, a incidência anual verificada é

inferior à registada nos países de clima tropical (<1 caso por 100 000 habitantes, anualmente) <sup>(49)</sup>.

### 2.2.2. Situação em Portugal (área endémica – Açores)

Em Portugal, a Leptospirose humana está presente no território continental, em particular na região centro e nas regiões autónomas da Madeira e dos Açores (nomeadamente, nas ilhas de São Miguel e Terceira) <sup>(27,108)</sup>. A informação registada pelas autoridades de Saúde e de Estatística, respetivamente a Direção-Geral de Saúde (DGS) e o Instituto Nacional de Estatística (INE), mostra que nestas regiões tem-se verificado a ocorrência de vários casos humanos, sendo maior a incidência no arquipélago açoriano do que no continente <sup>(18,108)</sup>. Esta doença assume-se, assim, como um grave problema de saúde pública no país, cujo diagnóstico, quando confirmado, deve ser declarado, o que infelizmente nem sempre acontece <sup>(18,108)</sup>.

As elevadas incidências anuais e a existência de registos de casos fatais, nos Açores, levaram nas últimas décadas à realização de estudos epidemiológicos da responsabilidade dos investigadores do Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme, um dos dois laboratórios de referência em Portugal para o diagnóstico humano de Leptospirose <sup>(18,108)</sup>, com vista a minimizar a morbilidade e mortalidade humanas, a par de uma sensibilização da população para conhecer os riscos de infeção por leptospiras.

Os estudos realizados pelos referidos investigadores permitiram determinar as taxas de infeção por Leptospirose de cada região endémica (hipo ou mesoendémica) de Portugal, tendo-se verificado uma incidência de 1,7 casos por 100 000 habitantes por ano no continente (no período entre 1986-2003); enquanto nos Açores se registaram 11,1 casos por cada 100 000 habitantes (entre 1992-2003) <sup>(18,44,108)</sup>. Estes dados, com base numa série de 18 e 13 anos, respetivamente, permitiram ter um conhecimento mais consentâneo da situação da Leptospirose em Portugal, ao mesmo tempo que puseram em evidência o contraste dos dados revelados pelas fontes oficiais (DGS e INE), reforçando a ideia de que os referidos dados estarão certamente subestimados devido ao facto de não se declarar esta doença após confirmação laboratorial <sup>(18,108)</sup>.

O arquipélago dos Açores é uma região insular com características propícias para a sobrevivência e disseminação das leptospiros, devido, essencialmente, ao clima semitropical existente, com condições atmosféricas favoráveis (temperatura amena, elevada precipitação e humidade) durante todo o ano, em particular nos meses de outono e inverno, e ainda à existência de fatores que favorecem a transmissão das leptospiros<sup>(108,115)</sup>. Estas características, assim como as atividades económicas da região (produção pecuária e agricultura), propiciam a dispersão e o elevado número de casos registados de Leptospirose<sup>(115)</sup>.

## 2.3. Agente etiológico – *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.)

### 2.3.1. Caracterização do agente etiológico

As leptospiros são bactérias aeróbias obrigatórias de estrutura fina, helicoidal, flexível, com extremidades curvas em forma de gancho e espiras regulares<sup>(22,36,43,44,55,56,107,112)</sup>. Têm reduzidas dimensões, apresentando 6-20 x 0,1-0,15 µm de comprimento e diâmetro, respetivamente, (Figura I 2.2); dimensões estas que exigem a utilização de microscopia de fundo escuro ou de contraste de fase para a sua observação<sup>(2,56,112)</sup>.

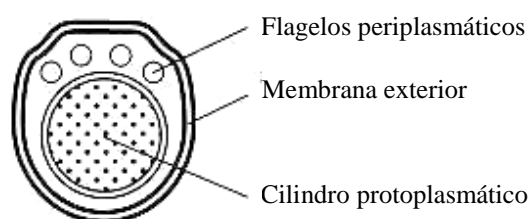


**Figura I 2.2.** Microfotografia eletrónica de *Leptospira* spp  
(adaptado de Adler & de la Peña Moctezuma, 2010<sup>(2)</sup>)

Do ponto de vista morfológico, as espécies do género *Leptospira* são indistinguíveis, sendo constituídas por uma parede celular com peptidoglicanos que, por sua vez, se encontra envolta por duas membranas, uma citoplasmática, que tem uma estreita ligação com a parede celular, e uma externa, formada por lipopolissacarídeos (LPS), entre outros constituintes lipídicos e proteicos que revestem a parede celular, a qual é

responsável pela antigenicidade, patogenicidade e virulência das leptospiras (2,22,36,56,112,116).

Na estrutura das leptospiras, fazem também parte um cilindro protoplasmático e dois flagelos periplasmáticos (Figura I 2.3), os quais estão na origem da sua motilidade, encontrando-se estes em toda a extensão da bactéria (espiroqueta), permitindo-lhe diversos tipos de movimentos, como o efeito em “saca-rolhas” e em “oito”, movimentos muito característicos e que tornam as leptospiras bactérias únicas, a este nível, no mundo microbiano (36,43,56).



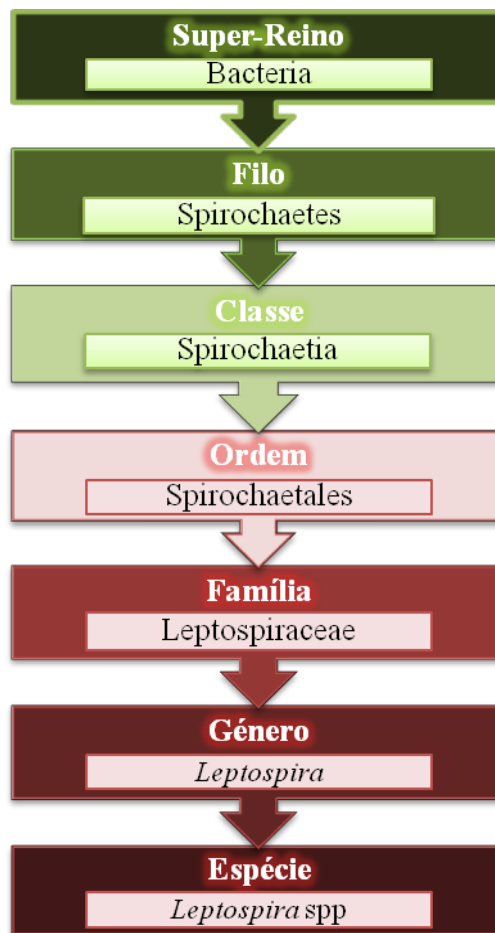
**Figura I 2.3.** Esquemática da morfologia de *Leptospira* spp em corte transversal  
(adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8451/>)

Para o crescimento “*in vitro*” das leptospiras, é necessário que existam determinados fatores no meio de cultura, como pH neutro e temperatura propícia (28°C-30°C), a presença de vitaminas (B1 e B12) e muito outros produtos indispensáveis ao seu exigente metabolismo (2,44,56).

No contexto molecular, o genoma leptospírico varia entre 3 900 e 5 000 quilobases (Kb), sendo constituído por dois cromossomas circulares, um de maior dimensão (aproximadamente 4 400 pares de bases) e outro mais pequeno (aproximadamente 350 pares de bases) (36,56).

### 2.3.2. Taxonomia

A hierarquia da classificação taxonómica do género *Leptospira* está representada na Figura I 2.4 <sup>(52,109)</sup>:



**Figura I 2.4.** Taxonomia de *Leptospira* spp  
(representação esquemática do autor)

#### 2.3.2.1. Classificação fenotípica e genotípica

A classificação das espécies do género *Leptospira* pode atualmente ser apresentada em dois sistemas distintos: classificação fenotípica, também denominada convencional, antigénica ou serológica, e classificação genotípica ou molecular <sup>(56,107,116)</sup>.

A classificação fenotípica é a mais tradicionalmente utilizada e tem por base a análise dos LPS e das características antigénicas das leptospiros <sup>(36,116)</sup>. O estudo da membrana

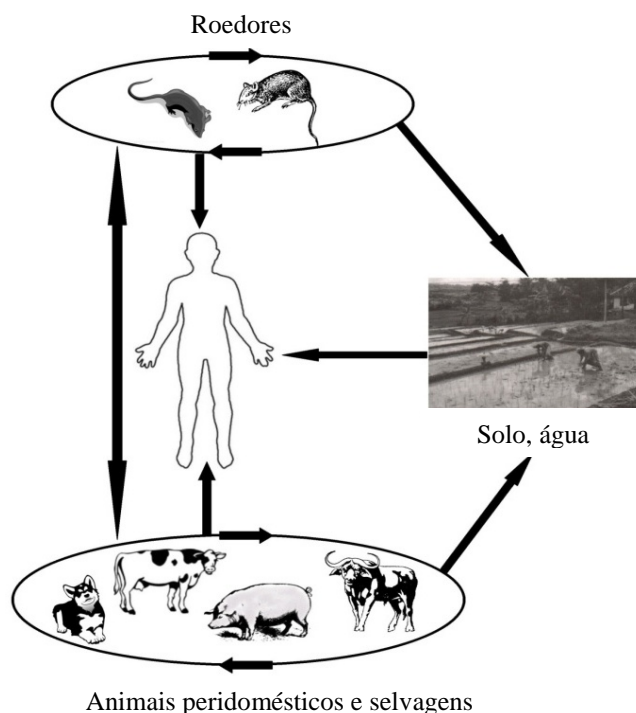
externa e, conseqüentemente, da antigenicidade das leptospiplas permite o reconhecimento dos serovares<sup>1</sup> através de diversas técnicas, entre as quais o Teste de Absorção Cruzada de Aglutininas (CAAT) e a utilização de soros hiperimunes e anticorpos monoclonais<sup>(36,44,116)</sup>. Os serovares que têm características antigénicas semelhantes agrupam-se em serogrupos, o que é de grande utilidade em estudos epidemiológicos e, sobretudo, no diagnóstico de rotina<sup>(56,109,116)</sup>. Neste sistema, encontram-se duas espécies distintas: *Leptospira interrogans* sensu lato (s.l.) e *Leptospira biflexa* s.l.. A primeira é constituída por todas as leptospiplas patogénicas, distribuídas por 24 serogrupos e mais de 250 serovares, enquanto a segunda compreende as leptospiplas saprófitas, classificadas em 38 serogrupos e 60 serovares<sup>(36,44,53,56)</sup>.

A classificação genotípica, por sua vez, baseia-se no estudo das sequências genéticas e da homologia entre elas. Para esta classificação, um dos métodos mais utilizados é a hibridização ADN-ADN<sup>(36,56,109,112)</sup>. Este tipo de classificação identificou até agora, pelo menos, 19 genomoespécies, sendo 13 patogénicas e seis saprófitas<sup>(36,56,76)</sup>.

### 2.3.3. Ciclo silvático

As leptospiplas são bactérias que vivem essencialmente nos túbulos renais dos hospedeiros/reservatórios (roedores)<sup>(109,118)</sup>. A dispersão das leptospiplas ocorre principalmente através da eliminação destas pela urina dos referidos roedores, o que implica a contaminação de solos e/ou águas superficiais, onde as leptospiplas podem permanecer por períodos de tempo indeterminado se as condições ambientais forem favoráveis<sup>(82,96,105,109)</sup>. Através do contacto direto ou indireto com as leptospiplas patogénicas, outros hospedeiros podem ficar infetados, contribuindo também para a disseminação destas espiroquetas (Figura I 2.5)<sup>(111)</sup>.

<sup>1</sup> Na classificação das leptospiplas, o serovar é o táxon base destas bactérias<sup>(19,112)</sup>.



**Figura I 2.5.** Ciclo de transmissão das leptospirosas  
(adaptado de <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/9/147/figure/F1?highres=y>)

### 2.3.3.1. Reservatórios/hospedeiros

Assim, para que o ciclo silvático das leptospirosas seja perpetuado, é necessário que existam roedores que são portadores renais crónicos, e por isso reservatórios das leptospirosas <sup>(36,49,56)</sup>. São inúmeros os animais infetados por estas espiroquetas, dos selvagens aos domésticos, incluindo os de produção pecuária, que assumem o papel de hospedeiros. Alguns destes, no entanto, acabam por desempenhar um papel de “reservatórios”, por se tornarem portadores crónicos, como é o caso dos bovinos <sup>(2,49,53)</sup>. Porém, o principal papel na transmissão de espiroquetas aos humanos cabe aos roedores <sup>(28,36,56,69,108,109)</sup>. Para que estes sejam bons reservatórios, necessitam de ter uma elevada suscetibilidade e uma baixa patogenicidade pelo agente infeccioso, mas também têm de ser portadores renais crónicos e tem de ocorrer uma transmissão natural intraespecífica <sup>(112,115)</sup>. Contudo, e como referido, existem hospedeiros também afetados com alguma frequência: bovinos, os mais comuns, equinos, suínos, canídeos e ovinos <sup>(2,49,56,98,108,109,115)</sup>.

Estes mamíferos são considerados hospedeiros acidentais, tal como os humanos, quando contactam com estes espiroquetídeos, podendo apresentar uma sintomatologia muito marcada e até levar à morte do hospedeiro. Nestes hospedeiros, acresce ainda alguma competência, embora limitada, para propagar a bactéria, contudo, nos humanos, tal geralmente não acontece, existem apenas descritas situações muito fortuitas, pois não têm essa “competência”, sendo mesmo considerados maus reservatórios <sup>(2,36,112,115)</sup>.

### **2.3.3.2. Modo de transmissão**

Para que ocorra infeção por leptospiras, tem de haver contacto com fontes contaminadas <sup>(2,49)</sup>. O modo de transmissão pode ser direto, com contacto da urina infetada excretada pelos reservatórios, ou indireta, através do contacto com terra, água ou alimentos contaminados com urina dos roedores, e ainda pelo contacto com vísceras de animais infetados <sup>(49,55,99,108,109,112,115)</sup>.

Existem diversas “portas de entrada”, tais como as mucosas, que permitem a invasão das leptospiras nas espécies animais atingidas, nomeadamente nos humanos <sup>(49,110)</sup>. Uma das principais barreiras destes hospedeiros acidentais é a pele, porém esta pode permitir a entrada das leptospiras quando apresenta alguma descontinuidade ou permeabilidade <sup>(49,55,56,99,110,115)</sup>.

A infeção humana encontra-se, pois, intimamente ligada às atividades humanas e à proximidade destas com os reservatórios <sup>(99,109)</sup>. As atividades/profissões em que existe maior risco de infeção são a agricultura, o exercício de veterinária, a construção civil, o saneamento básico e qualquer trabalho que envolva proximidade com animais, solo e/ou águas <sup>(108,109)</sup>. Contudo, também algumas atividades desportivas e/ou de lazer, como a prática de golfe, canoagem, pesca desportiva em coleções de água doce, entre outras, têm assumido um importante papel na epidemiologia da Leptospirose <sup>(109)</sup>.



### 2.3.4. Ecologia

Como foi referido, as espécies do género *Leptospira* têm contacto com o ambiente quando são excretadas pela urina dos animais reservatórios <sup>(49)</sup>. O período de sobrevivência destas bactérias ao ar livre é variável, todavia, em média, o tempo máximo que podem permanecer viáveis fora do reservatório ou de um hospedeiro acidental é de cerca de 180 dias, dependendo da existência das condições ambientais favoráveis <sup>(49,55,115)</sup>. Os fatores propícios para essa sobrevivência são, assim, a existência de um clima húmido e quente (aproximadamente 22°C); o pH da urina dos hospedeiros acidentais ser aproximadamente neutro; e a presença de água no local <sup>(15)</sup>. Por estes motivos, a grande dispersão das espécies do género *Leptospira* encontra-se principalmente em regiões de clima temperado e tropical <sup>(15,22,49,99,115)</sup>.

O aumento da temperatura, uma maior ocorrência de precipitação decorrente das alterações climáticas (que pode provocar inundações) e também as alterações paisagísticas, que obrigam os reservatórios a procurar novos locais para se abrigarem e encontrarem alimento, de que são exemplo as áreas urbanas onde surgem surtos epidémicos, interferem quase sempre com o modo de transmissão das leptospirosas, de que resulta invariavelmente um aumento da incidência mundial da doença <sup>(18,49,86)</sup>.

### 2.4. Manifestações clínicas

A Leptospirose é uma patologia que apresenta uma grande diversidade e inespecificidade sintomatológica <sup>(53,69,98,110)</sup>.

Manifesta sinais clínicos, geralmente após um período de incubação entre 2 e 20 dias <sup>(44,56,98)</sup>. Após esse período, ocorre o início da fase aguda, também denominada fase de leptospiémia ou septicémica, a que se segue a fase imune, igualmente conhecida como imunológica ou fase de leptospiúria <sup>(44,56,98,107)</sup>. A fase aguda corresponde, assim, ao período em que se verificam as manifestações clínicas mais evidentes, seguindo-se a produção de anticorpos específicos (fase imune), da qual resulta a eliminação das leptospirosas pela urina (leptospiúria) <sup>(43,44,56,98)</sup>.

A diversidade de manifestações clínicas presentes na Leptospirose torna difícil o seu diagnóstico devido à elevada semelhança sintomatológica com outras patologias de natureza infecciosa, como gripe, febre da dengue, malária, meningite, entre outras doenças virais, bacterianas ou parasitárias <sup>(19,49,56)</sup>.

De acordo com o caráter das manifestações clínicas, a Leptospirose é considerada anictérica ou ictérica (doença de Weil) conforme apresenta sintomas moderados ou de elevada gravidade, respetivamente <sup>(27,56)</sup>.

#### **2.4.1. Forma anictérica e ictérica**

A Leptospirose anictérica é a apresentação mais comum <sup>(105)</sup> e corresponde a um quadro clínico variável, indistinguível e de menor gravidade <sup>(27)</sup>, sendo os sintomas mais observados: febre; arrepios; dores de cabeça; mialgias; dores abdominais; náuseas; vômitos; anorexia; erupções cutâneas; hepatoesplenomegalia e linfadenopatias, entre outros <sup>(27,28,43,49,55,56,69,98,109)</sup>. Porém, estes últimos sintomas são menos frequentes <sup>(55,98,109)</sup>. Ao envolvimento do sistema imunitário corresponde uma diminuição da referida sintomatologia <sup>(56)</sup>.

O quadro clínico considerado como Leptospirose ictérica tem como principais características a elevada severidade <sup>(27,56,98)</sup> e uma evolução rápida, o que pode levar à morte do paciente <sup>(56,69)</sup>, situação conhecida como Leptospirose fulminante. Nesse caso, as manifestações clínicas mais evidentes são: icterícia, insuficiência renal aguda, falência multiorgânica, em particular com grave compromisso hepático (com acentuada icterícia) e pulmonar, além do compromisso renal, por vezes a presença de meningite e síndrome hemorrágica pulmonar, entre outras complicações <sup>(27,43,55,69,98,109,110)</sup>.

#### **2.5. Diagnóstico laboratorial**

Devido às inúmeras manifestações clínicas e ao contexto epidemiológico, o diagnóstico clínico deve ser confirmado laboratorialmente. Assim, recorre-se quer a métodos diretos

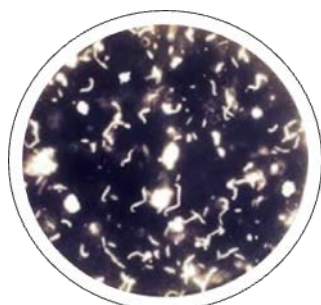
que permitem a deteção das leptospiros (cultura, microscopia de fundo escuro e/ou deteção de ADN específico), quer a métodos indiretos (técnicas de rastreio e de referência), que comprovam, ou não, a presença de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* em amostras biológicas dos doentes <sup>(2,28,75,109,112)</sup>. De entre as diversas metodologias laboratoriais, o isolamento (cultura) é considerado como técnica “*Gold standard*” para o diagnóstico definitivo <sup>(19,28)</sup>. Porém, devido à elevada complexidade de execução e morosidade, o que constituem desvantagens da técnica, atualmente só se utiliza para estudos epidemiológicos <sup>(11,12,18,19,100)</sup>. Na generalidade das situações, o diagnóstico laboratorial baseia-se em testes serológicos, sendo que nos primeiros dias de infeção, e face à ausência de anticorpos específicos, a opção deve passar pelo recurso à utilização da técnica de PCR, que permite detetar ADN leptospírico em amostras de sangue total e/ou de soro <sup>(11,12,18,19,100)</sup>.

### 2.5.1. Métodos diretos

#### 2.5.1.1. Microscopia de fundo escuro

As espécies do género *Leptospira* são passíveis de ser observadas exclusivamente sob microscopia de fundo escuro (Figura I 2.6), onde é possível observar algumas características morfológicas destas espiroquetas, desde a estrutura e forma até ao movimento característicos <sup>(18,112)</sup>.

Para se obter um diagnóstico fidedigno por microscopia de fundo escuro, exige-se uma grande experiência por parte do observador e a presença de uma concentração de leptospiros na amostra, no mínimo de  $10^4$  leptospiros/ml <sup>(18,44,56)</sup>.



**Figura I 2.6.** Imagem de microscopia de fundo escuro com bactérias do género *Leptospira* (adaptado de <http://www.austincc.edu/microbio/2704x/li.htm>)

### 2.5.1.2. Detecção de ADN leptospírico

As técnicas moleculares permitem a identificação até à espécie do género *Leptospira* e a distinção entre patogénicas e saprófitas <sup>(18,56,104)</sup>. A abordagem molecular para o diagnóstico da Leptospirose permite detetar ADN leptospírico através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que é um método muito utilizado devido à sua elevada especificidade e sensibilidade <sup>(13,28,98)</sup>, apesar de ser uma técnica dispendiosa <sup>(28)</sup>. Este método de detecção das leptospirosas, embora não muito útil em estudos epidemiológicos, por obrigar à realização de outras técnicas moleculares complementares, é de grande utilidade no diagnóstico clínico durante os primeiros dias de infeção, período no qual os anticorpos anti-*L. interrogans* não são detetáveis, além de ser igualmente muito útil em estudos *post-mortem* <sup>(19,56)</sup>.

### 2.5.2. Métodos indiretos

Os métodos indiretos para o diagnóstico laboratorial da Leptospirose normalmente adotados pelos laboratórios de referência são exames serológicos <sup>(15,18,56)</sup>. Estes testes são utilizados para verificar a existência de anticorpos anti-*L. interrogans*, porém não são úteis, como referido anteriormente, em fase muito precoce, dada a inexistência dos referidos anticorpos <sup>(13,15)</sup>.

#### 2.5.2.1. Técnica de aglutinação macroscópica (MACROLepto – Técnica de Rastreio)

O teste MACROLepto é um teste serológico realizado exclusivamente para o rastreio desta bacteriose, sendo sempre necessária a confirmação do resultado pela técnica de aglutinação microscópica (TAM), técnica de referência <sup>(18,112)</sup>. Todavia, diversas instituições de saúde optam por adotar apenas a técnica de rastreio para o diagnóstico laboratorial da Leptospirose devido à rapidez de execução e ao seu baixo custo <sup>(18,55,112)</sup>.

Este teste tem elevada sensibilidade e baixa especificidade, tendo por base uma reação antígeno-anticorpo, observável pela aglutinação produzida quando um soro “problema” reage com antígenos preparados previamente a partir de diversos serovares. Esta técnica permite, assim, evidenciar a possível existência de resposta humoral materializada pela presença de anticorpos no referido soro “problema” na altura da colheita da amostra <sup>(18,44,56,107)</sup>.

### 3.5.2.2. Técnica ELISA

Além da técnica de rastreio já referida, a técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é considerada também um teste de rastreio para o diagnóstico da Leptospirose, que pode ser adotado pela generalidade dos laboratórios por ser um teste acessível, sensível e de fácil realização, contribuindo para uma resposta rápida <sup>(19,69)</sup>. Todavia, este teste necessita sempre da aplicação da técnica de referência para a confirmação do resultado <sup>(69)</sup>.

O teste ELISA é uma técnica baseada também numa reação antígeno-anticorpo, existindo vários tipos de testes ELISA que permitem a pesquisa dos anticorpos específicos no soro, sendo que o diagnóstico da Leptospirose é particularmente focado no estudo dos anticorpos do tipo M (imunoglobulina M) <sup>(69)</sup>. O teste IgM- ELISA tem uma elevada sensibilidade, sendo mesmo superior à observada pela técnica de referência (TAM) <sup>(56,57)</sup>, porém a sua especificidade é baixa comparativamente à TAM, devido à necessidade da identificação do serovar infetante, a qual não é obtida por este teste <sup>(10,15)</sup>. Com a deteção de anticorpos anti-*Leptospira* IgM, é possível ter um diagnóstico precoce da Leptospirose <sup>(55,56)</sup>. Além da fase inicial, a fase tardia da doença também pode ser diagnosticada pela mesma técnica nesse caso, com particular enfoque para a presença das imunoglobulinas G (IgG) <sup>(56,107)</sup>.

### 3.5.2.3. Técnica de aglutinação microscópica (TAM – Técnica de Referência)

A técnica de referência “Técnica de Aglutinação Microscópica” (TAM) é o teste serológico considerado “*Gold standard*”, preconizado pela OMS, para o diagnóstico da Leptospirose. Este teste baseia-se também numa reação antigénio-anticorpo. É utilizada uma bateria de antigénios vivos que inclui 24 serovares de leptospiros patogénicas (*L. interrogans* s.l.) e um serovar representante de *L. biflexa* s.l. (saprófita) (2,11,19,55,56,80,98,99,112). Esta técnica tem uma elevada sensibilidade e especificidade (2,10,112) mas exige, pelo menos, duas amostras distintas, uma obtida na fase aguda e outra mais tardia, após cerca de duas semanas, para permitir acompanhar a cinética de anticorpos específicos, possibilitando o diagnóstico definitivo com a determinação, sempre que possível, do serogrupo da estirpe infetante, o que é muito importante do ponto de vista epidemiológico dado que permite conhecer as principais leptospiros circulantes numa determinada região/país (28,33,55,80,98,109).

As exigências da técnica em termos de execução e manutenção das leptospiros vivas, com recurso a equipamentos específicos, obrigam à exclusiva realização do método por laboratórios de referência (19,33,100).

## 3.6. Tratamento, prevenção e controlo

O tratamento da Leptospirose deve ser realizado na fase aguda e o mais precocemente possível, sendo mesmo, por vezes, administrado antes do diagnóstico do paciente, a fim de minorar/evitar a progressão da infeção (18,49,55). A terapêutica é sobretudo baseada na administração de antibióticos, em particular doxiciclina, o mais recomendado, e penicilinas, entre outros (18,49,109).

Para a prevenção e controlo da doença, é necessário ter em consideração dois pontos fulcrais: o modo de transmissão das espiroquetas, particularmente por animais, e o modo como as leptospiros se dispersam no ambiente (109). Prevenir e controlar esta bacteriose exige a implementação de determinadas estratégias que protejam as populações humanas e animais, em particular os de produção pecuária, de que se destacam a utilização de vestuário apropriado/protetor quando da realização de

atividades de risco <sup>(49,55,98)</sup>; melhoria das condições higieno-sanitárias; controlo de águas e alimentos de consumo em regiões endémicas <sup>(49,55)</sup>; vigilância e vacinação dos animais com fácil contacto com fontes de risco <sup>(49,98)</sup>; prevenção do contacto entre animais peridomésticos e roedores, podendo ser necessária a eliminação/diminuição destes últimos <sup>(49)</sup>; esclarecimento das populações sobre a Leptospirose e fontes de risco <sup>(49,109)</sup>; e realização do tratamento e vacinação das populações em regiões endémicas <sup>(98,109)</sup>.

No entanto, apesar de útil, a vacinação também é problemática tanto para animais como para os humanos, devido à sua especificidade, pois geralmente a cada vacina estão associados serovares que nem sempre estão representados em todas as regiões, e, por consequência, as vacinas existentes até ao presente não conferem total proteção, mas apenas nas regiões onde os referidos serovares são circulantes. É ainda de referir o facto de o seu efeito protetor também ser curto <sup>(49)</sup>. Porém, alguns países adotaram esta forma de prevenção (por exemplo Cuba), apesar de não existir ainda um consenso mundial <sup>(22)</sup> sobre esta abordagem profilática.

### **3. FASCIIOLOSE**



### 3.1. Dados históricos relevantes

A Fasciolose humana é uma parasitose que tem afetado a população humana desde os primórdios, segundo estudos paleoparasitológicos que têm sido realizados e nos quais foi possível verificar a existência de vestígios do género *Fasciola* <sup>(66,67)</sup>.

Na Europa, especificamente em França, foi registado um grande surto de Fasciolose humana classificado como uma epidemia em 1957, como citado em Almeida, 2011 <sup>(6)</sup>. Contudo, esta parasitose foi primeiramente descrita no Homem por Pallas, em 1760, apesar de já existirem alusões à presença do parasita em humanos desde o século XVII <sup>(6,46)</sup>. A Fasciolose humana sempre foi encarada como uma zoonose secundária por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS) por estar relacionada com casos únicos e esporádicos em diversos países <sup>(66,78)</sup>. Esta notificação foi alterada, sendo que a importância desta parasitose aumentou nos últimos anos, registando-se 2 594 casos de pessoas infetadas em todo o mundo entre 1970-1990, o que permitiu que atualmente seja atribuída uma elevada relevância à Fasciolose humana nas parasitoses que atingem o Homem <sup>(65,92,93)</sup>.

Em Portugal continental também se encontram registos de Fasciolose humana, sendo que a primeira identificação surgiu em 1948 por Fernando Fonseca e Fraga de Azevedo <sup>(38,103)</sup>. Ao longo dos anos têm surgido vários casos de infeções humanas por esta zoonose, sendo disso exemplo os registos efetuados por Maria de Lurdes Silva *et al.*, entre 1970 e 1973, que mostraram uma grande incidência desta parasitose no norte do país, como citado por Trinca & Rombert, 1978 <sup>(103)</sup>. Além do continente, também as regiões insulares são afetadas por esta doença, tal como a ilha da Madeira, onde a doença foi registada no início dos anos 50 por Celestino Maia, como citado por Ferreira & Oliveira, 1960 <sup>(38)</sup>.

### 3.2. Epidemiologia

A Fasciolose é uma doença que afeta principalmente animais, originando profundas perdas económicas, particularmente animais domésticos e de produção pecuária <sup>(77)</sup>.

A Fasciolose animal tem vindo a ser considerada como uma das principais causas para os surtos de Fasciolose humana devido ao facto de os ruminantes domésticos serem os

hospedeiros definitivos <sup>(6,65,114)</sup>. Contudo, tem-se vindo a constatar uma proporcionalidade inversa das taxas de prevalência em ambas as parasitoses, levando a crer que a relação entre a Fasciolose animal e a humana só existe num estado inicial da infeção <sup>(6,65,114)</sup>.

Por esta razão, torna-se necessário uma atualização epidemiológica da Fasciolose com novos padrões de classificação, para evidenciar as características que atualmente concorrem para uma distribuição assimétrica desta parasitose <sup>(65,67,92)</sup>. Esta alteração pretende ajudar na avaliação da gravidade da Fasciolose humana e contribuir para o controlo do parasita <sup>(65,67,92)</sup>. Estes novos argumentos são essencialmente decompostos nas seguintes categorias: casos importados; casos esporádicos, não constantes, isolados e autóctones; casos registados nas áreas endémicas de Fasciolose humana, denominando-se áreas hipoendémicas (prevalência inferior a 1%), áreas mesoendémicas (prevalência entre 1% e 10%) e áreas hiperendémicas (prevalência superior a 10%); e, por fim, epidemias assinaladas em áreas endémicas, onde a Fasciolose animal pode proporcionar a ocorrência de surtos de Fasciolose humana e nas áreas endémicas de Fasciolose humana (hipo, meso e hiperendémicas propriamente ditas) podem surgir epidemias no Homem <sup>(6,65,66,67,92,114)</sup>.

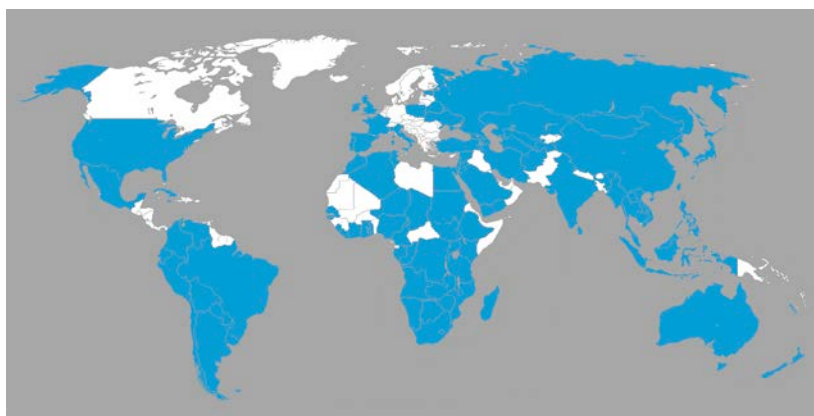
A OMS considera que esta parasitose negligenciada necessita de vigilância epidemiológica devido ao seu carácter emergente/reemergente <sup>(39,62)</sup>, ao facto de a sua localização ser essencialmente rural <sup>(85)</sup>, à sua distribuição mundial <sup>(62)</sup> e ao seu endemismo marcante em países subdesenvolvidos <sup>(39)</sup>. Apesar da importância desta parasitose na saúde pública, não é considerada a obrigatoriedade de declaração desta doença, culminando na necessidade de se recorrer a unidades médicas com o objetivo de verificar a prevalência desta helmintose no Homem, através de estudos retrospectivos <sup>(83)</sup>.

Esta parasitose, no ser humano, tem padrões distintos na sua distribuição populacional que variam consoante os países em que se encontra, principalmente em regiões hiperendémicas. Nestas, verifica-se que a população adulta é afetada por esta parasitose, contudo são as crianças na faixa etária entre os 9 e os 11 anos que constituem a população mais afetada por esta parasitose <sup>(6,66,67)</sup>. Outra característica de realçar no

contexto populacional é a diferença entre géneros, sendo que geralmente é o género feminino o mais atingido por esta parasitose <sup>(6,66,67)</sup>.

### 3.2.1. Distribuição mundial

A Fasciolose tem sido alvo de uma ampla preocupação em termos de saúde pública devido à sua distribuição mundial (Figura I 3.1) ser muito acentuada, o que se deve à grande adaptação das espécies de *Fasciola* aos diferentes hospedeiros intermediários e definitivos, essencialmente a espécie *F. hepatica* <sup>(8,37,106)</sup>. Esta dispersão verifica-se em 51 países em vários continentes, onde foi verificado um grande número de doentes infetados (7 071 casos), com maior ênfase na América, Europa e África, como referido no estudo dos últimos 25 anos realizado por Esteban et al., como citado por Mas-Coma, Esteban & Bargues, 1999; Mas-Coma, 2004; Mas-Coma, Bargues & Valero, 2005; Saba & Korkmaz, 2005 <sup>(65,66,67,92)</sup>.



**Figura I 3.1.** Distribuição mundial de parasitas do género *Fasciola* spp  
(in: <http://www.bvgh.org/Biopharmaceutical-Solutions/Global-Health-Primer/Diseases/cid/ViewDetails/ItemID/23.aspx>)

Outro estudo fez uma apreciação geral da Fasciolose humana, mostrando que, possivelmente, entre 2,4 e 19 milhões de pessoas se deparam com esta parasitose <sup>(39)</sup>. Estes valores atualmente referidos são valores longe da realidade e pensa-se que possam ser ainda maiores <sup>(65,66)</sup>. Além desta avaliação, pressupõe-se que 180 milhões de pessoas

podem futuramente contrair esta parasitose, por contacto direto ou indireto com o parasita <sup>(59,61,68)</sup>.

Os países com endemismo mais relevantes são: Bolívia, Peru, Chile, Equador, Cuba, Egito, República Islâmica do Irão, Portugal, França e Espanha <sup>(67,113,114)</sup>, nos quais há registos de graves casos clínicos <sup>(61,67,114)</sup>. A Bolívia, por exemplo, é o país com maior endemismo humano no mundo, particularmente em determinadas localidades de maior altitude, onde se encontra um elevado número de pessoas com Fasciolose, entre 72% e 100% <sup>(50,67)</sup>. Sabe-se ainda através de estudos de diferenciação de espécies que o parasita existente neste país é semelhante ao observado em Espanha <sup>(106)</sup>.

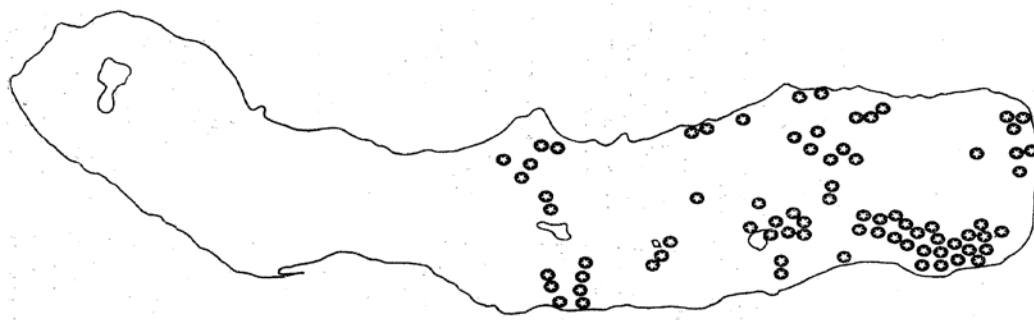
### **3.2.2. Situação em Portugal (área endémica – Açores)**

A Fasciolose humana ocorre principalmente no norte e centro de Portugal continental <sup>(67,74)</sup>. O maior número de casos humanos encontrados em Portugal verifica-se no norte do país, onde foram registados 77 casos humanos em 1984, 561 casos em 1990, e onde em meados dos anos 90 ocorreu um estudo retrospectivo com a verificação de 1 011 casos da doença, como citado por Mas-Coma, Bargues & Valero, 2005 <sup>(67)</sup>. Todos estes dados contribuíram para que se considerasse esta região de Portugal como uma área endémica <sup>(67)</sup>.

Como referido anteriormente, a Fasciolose é uma helmintose presente em Portugal mas também em regiões insulares, como os arquipélagos dos Açores e da Madeira.

O arquipélago dos Açores é constituído por nove ilhas vulcânicas localizadas a norte do oceano Atlântico, sobre placas tectónicas, com um clima essencialmente temperado <sup>(64,74)</sup>. São Miguel é a ilha de maiores dimensões neste arquipélago, com 65 km de comprimento por 16 km de largura e uma área de 759,41 km<sup>2</sup> <sup>(1)</sup>. A densidade populacional é de cerca de 137 699 habitantes <sup>(89)</sup>. Não se pode generalizar o clima verificado nos Açores a todas as ilhas, pois a geografia de São Miguel é essencialmente constituída por zonas montanhosas e por cordilheiras, proporcionando a presença de microclimas nas suas diversas regiões <sup>(74)</sup>. A ilha de São Miguel apresenta, assim, as condições climáticas (luminosidade, temperatura, precipitação e humidade) e ambientais (como a diversidade dos cursos de água e os solos favoráveis) necessárias à

sobrevivência, desenvolvimento e propagação do parasita e do hospedeiro intermediário, o molusco *Lymnaea truncatula*, que só existe no lado oriente da ilha (Figura I 3.2) <sup>(70)</sup>.



**Figura I 3.2.** Distribuição geográfica do hospedeiro intermediário *Lymnaea truncatula* na ilha de São Miguel (adaptado de: Mendonça & Barata, 1989 <sup>(72)</sup>)

A Fasciolose humana é uma parasitose endémica em São Miguel, registada desde 1990, com base em casos humanos em regiões de Fasciolose bovina, uma vez que esta parasitose atinge com maior intensidade os bovinos na região, como citado em Mendonça, Barata, Rombert & Martins, 1996 e Mendonça, Barata & Soares, 1993 <sup>(73,74)</sup>.

Na Região Autónoma da Madeira, a Fasciolose humana também está presente, como se pode observar pelos casos registados em estudos em 1990, como citado por Fonseca, Bastos & Almeida, 1991 <sup>(42)</sup>. Esta propagação nos humanos é proveniente da elevada prevalência e disseminação do hospedeiro intermediário, e do parasita, bem como da existência de condições edafoclimáticas propícias nesta região <sup>(42)</sup>. Ainda é possível verificar a existência dos hospedeiros definitivos, especificamente bovinos, os quais são bastante afetados, originando elevados custos de sustentabilidade das produções pecuárias <sup>(42)</sup>.

### 3.3. Agente etiológico – *Fasciola hepatica*

O helminta *Fasciola hepatica* é o agente etiológico mais comumente responsável pela Fasciolose no mundo <sup>(8,35,59)</sup> devido à sua aptidão para dispersar, colonizar e suportar ambientes adversos, como por exemplo a altitude das regiões montanhosas, sendo esta

espécie exclusiva destes locais <sup>(6)</sup>. Todavia, esta espécie consegue dar continuidade à zoonose de que é responsável, e também com o auxílio do seu hospedeiro intermediário, que por seu lado apresenta igualmente uma grande disseminação <sup>(6)</sup>.

### 3.3.1. Caracterização do agente etiológico

O trematode *F. hepatica* (Figura I 3.3) é caracterizado pela sua morfologia polimórfica durante o seu ciclo de vida, contudo, em adulto, é achatado dorsoventralmente, com grandes dimensões (20-40 x 10-20 mm de comprimento e de largura, respetivamente <sup>(87)</sup>), sendo, por isso, um dos maiores parasitas a afetar o homem <sup>(6,16,26,87)</sup>. Pode apresentar uma coloração com diversos tons de castanho, sendo idêntico a uma folha elítica e constituído anatomicamente por um tegumento com pequenas e ínfimas espículas e por duas ventosas (oral e ventral, ou acetábulo) <sup>(6,16,26,87)</sup>. Estas características permitem a fixação do parasita <sup>(6,16,26,87)</sup>.

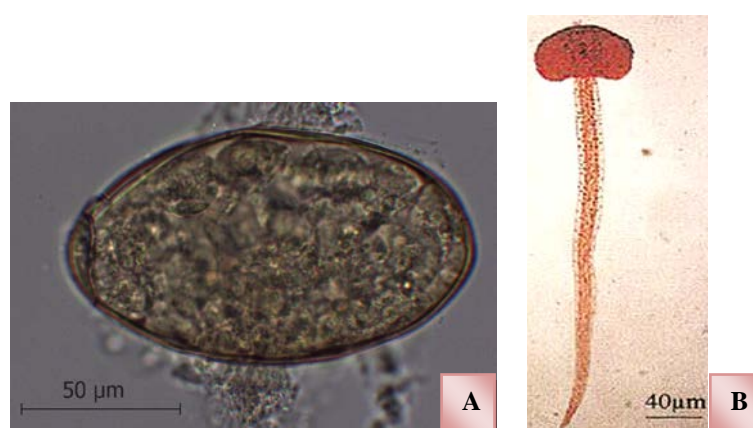
Os processos fisiológicos do parasita são processados pelo sistema digestivo, incompleto, que é constituído por cone cefálico (onde é possível encontrar as ventosas anteriormente referidas), abertura bucal, faringe, esófago, intestino ramificado, devido aos divertículos que se encontram espalhados por todo o corpo do parasita, e cegos <sup>(5,26,87)</sup>; é também constituído por um sistema excretor igualmente ramificado (protonefrítico) <sup>(26)</sup>, por um sistema neuroendócrino <sup>(26)</sup> e por um sistema reprodutor onde se verifica a presença dos dois sistemas de reprodução (hermafrodita), permitindo uma autorreprodução, mas também uma reprodução com outros parasitas da mesma espécie <sup>(6)</sup>. Na parte anterior do corpo do helminta, localiza-se o sistema reprodutor feminino, que é composto por um poro genital, um tubo uterino, um oótipo, um oviduto e um ovário espalhado por todo o corpo do parasita <sup>(26,87)</sup>. O aparelho reprodutor masculino situa-se na parte posterior central do trematode e é constituído por dois testículos ramificados, por dois canais – o eferente e o deferente –, pela bolsa de cirro, pela vesícula seminal e pelo cirro (órgão reprodutor) <sup>(26,87)</sup>.



**Figura I 3.3.** Imagem do parasita *Fasciola hepatica*  
(adaptado de: <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/epi.html>)

Os ovos de *F. hepatica* (Figura I 3.4 A) apresentam uma forma oblonga com a cor característica do parasita adulto <sup>(26,87)</sup>; têm uma dimensão de 130-150 x 60-100  $\mu\text{m}$  de comprimento e de largura, respetivamente <sup>(26,87)</sup>; são compostos por um invólucro fino, e anatomicamente contêm um opérculo numa das extremidades do ovo que proporciona a saída do miracídeo quando este se encontra completamente formado <sup>(5,26,87)</sup>.

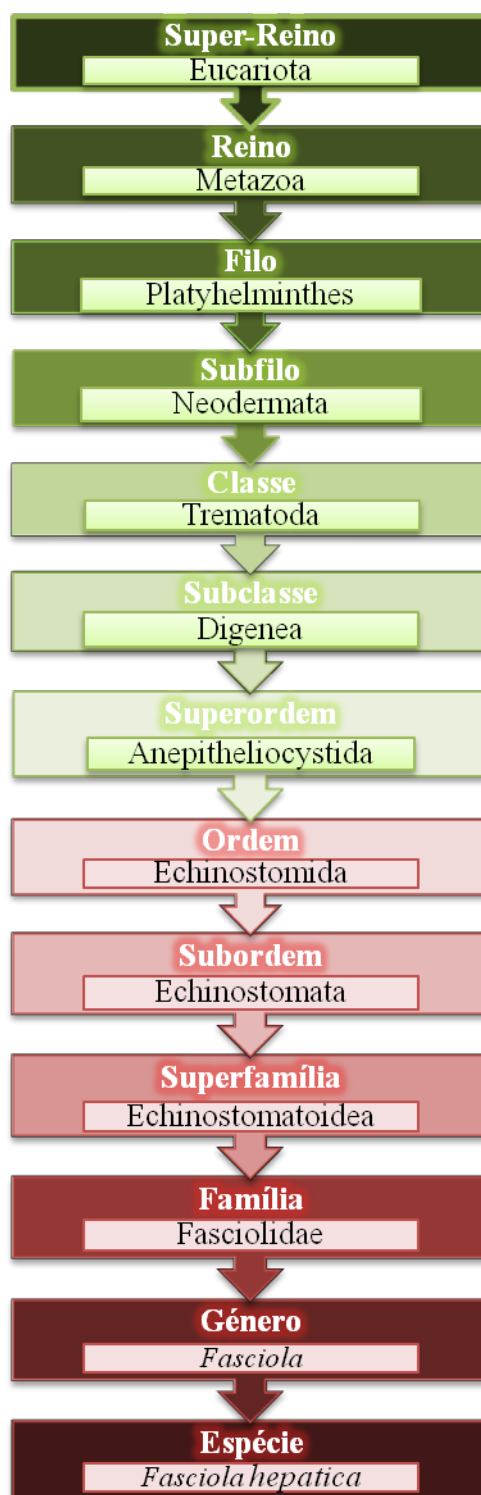
A cercária (Figura I 3.4 B), uma das fases de vida livre do parasita *F. hepatica*, é formada por dois segmentos: o corpo ovoide de 20  $\mu\text{m}$  e uma cauda não bifurcada, com 500  $\mu\text{m}$  de comprimento, para que esta forma parasitária se possa movimentar <sup>(87)</sup>.



**Figura I 3.4.** **A-** Ovo de *Fasciola hepatica* a 40x (cortesia de Mendes, T., IHMT/UNL, 2012);  
**B-** Cercária de *Fasciola hepatica* (adaptado de: Hurtrez-Boussès, Durand & Renaud, 2001 <sup>(50)</sup>)

### 3.3.2. Taxonomia

A taxonomia (Figura I 3.5) de *F. hepatica* compreende a seguinte hierarquia <sup>(6,51,87,101)</sup>:



**Figura I 3.5.** Taxonomia de *Fasciola hepatica*  
(esquema original do autor)



### 3.3.3. Ciclo silvático da espécie

#### 3.3.3.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida deste helminta é constituído por duas fases que dependem do hospedeiro definitivo. Uma das fases corresponde a todas as transformações por que o parasita passa fora do hospedeiro definitivo (fase exógena) e a outra fase corresponde à vida do parasita dentro do hospedeiro definitivo (fase endógena) <sup>(72,74)</sup>.

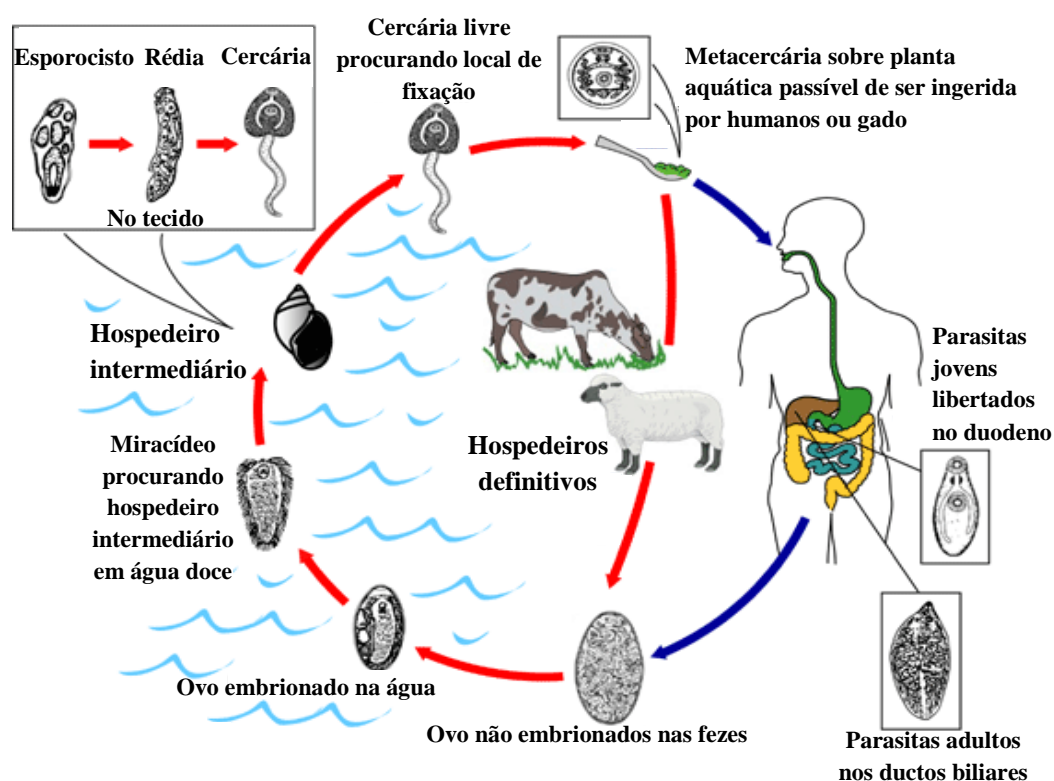
Atualmente o ciclo biológico de *F. hepatica* (Figura I 2.6) pode ser dividido em três estádios: o intravertebrado, o intramolusco e o enquistamento em plantas ou na água <sup>(50)</sup>. A fase intravertebrada corresponde ao envolvimento do hospedeiro definitivo, geralmente um mamífero vertebrado, com o parasita <sup>(50)</sup>. Para que estes hospedeiros fiquem infetados, têm de ingerir a forma infetante da fasciola, a metacercária (quisto infeccioso), que por ação exclusiva dos enzimas presentes no suco gástrico do hospedeiro origina a libertação das jovens fascíolas <sup>(50,72)</sup>. O intestino é uma das primeiras barreiras que as fascíolas imaturas necessitam de atravessar para conseguirem chegar aos ductos biliares <sup>(8,31,35,50)</sup>. Após saírem do intestino, estas fascíolas imaturas movimentam-se na cavidade peritoneal até chegarem ao fígado, sendo este o órgão que vai permitir a entrada do parasita nos ductos, onde migram nos tecidos hepáticos (parênquima) até atingirem a localização final pretendida <sup>(8,31,35,50)</sup>. Os ductos biliares vão permitir ao parasita realizar a maturação física e sexual, possibilitando a ocorrência da reprodução sexuada <sup>(31,50)</sup>.

Os ductos biliares, além de permitirem o desenvolvimento da fasciola, possibilitam a realização da postura dos ovos não-embrionados, obrigando, para a formação do parasita, à saída destes ovos com auxílio da bÍlis, originando a sua migração até ao intestino, sendo posteriormente expulsos pelo hospedeiro através dos dejetos <sup>(50)</sup>. Para a ocorrência e o desenvolvimento dos ovos, é necessária a existência de condições propícias, que compreendem águas correntes, luz e temperatura favoráveis, permitindo posteriormente o desenvolvimento e a libertação dos miracídeos <sup>(66)</sup>.

A eclosão e a rápida movimentação dos miracídeos na água proporcionam a procura do melhor hospedeiro intermediário para a sua sobrevivência <sup>(50)</sup>. Após estas ocorrências, inicia-se a fase intramolusco, em que o miracídeo efetua três transformações consecutivas, com início no esporocisto, seguido das rédias (1.<sup>a</sup> e 2.<sup>a</sup> e/ou 3.<sup>a</sup> geração),

terminando na forma de cercárias, as quais, após a maturação, têm a capacidade de se evadir do molusco para o ambiente aquático <sup>(16,50,74,87)</sup>. A reprodução assexuada do miracídeo vai permitir em cada estágio o aumento do número de parasitas <sup>(16,50,74,87)</sup>.

Após a saída da cercária do hospedeiro intermediário, e depois de nadar ativamente, tem lugar a última fase do ciclo de vida, que corresponde à sua fixação, geralmente em plantas que têm contacto com coleções de água doce <sup>(50,66)</sup>. Esta agregação permite assim a formação da metacercária ou quisto, que após 24 horas se torna infetante, bem como auxilia na sua sobrevivência sob condições ecológicas e climáticas adversas <sup>(50,66)</sup>.



**Figura I 3.6.** Ciclo de vida de *Fasciola hepatica*  
(adaptado de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/fascioliasis.htm>)

### 3.3.3.2. Modo de transmissão

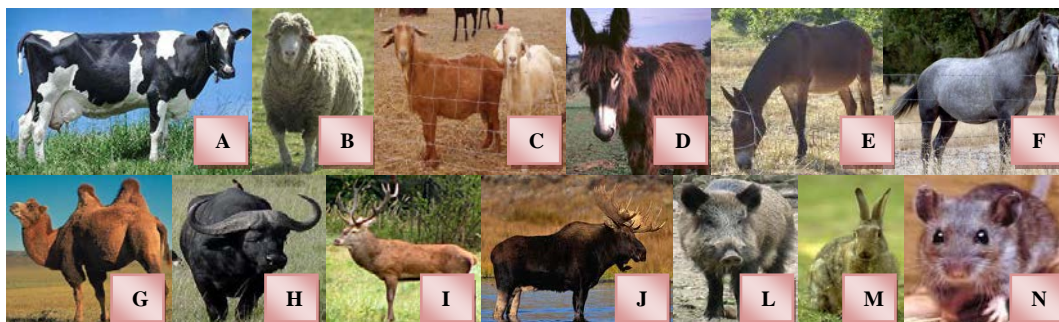
As principais vias conhecidas possíveis de infetar o Homem, porque contaminadas com *F. hepatica*, são: o consumo de novos e diferentes vegetais, bem como o diferente modo de cozinhá-lo, em particular plantas de água doce, como o agrião e o agrião selvagem; com menor enfoque, e resultante da localização, existem também dente-de-leão, alface-

de-cordeiro, hortelã, algas <sup>(65,113)</sup> e poejo, entre outras igualmente susceptíveis por contaminação por *F. hepatica*. Estas plantas podem ser selvagens mas também cultivadas, como sucede com o agrião, sendo que tanto o agrião comum como o agrião selvagem são utilizados no regime alimentar humano <sup>(113)</sup>. As plantas terrestres também podem ser afetadas pela metacercária através da respetiva submersão em períodos de elevada pluviosidade ou da utilização de sistemas de irrigação, ou ainda pelo hospedeiro intermediário <sup>(113)</sup>.

Além das plantas, a água é outra fonte de contaminação devido às várias utilizações no consumo humano do quotidiano, como a sua ingestão e utilização na preparação de alimentos, mas também indiretamente, na higienização de materiais utilizados no dia a dia (roupa e utensílios de cozinha) e sistema de rega em plantações <sup>(65,113)</sup>.

#### **3.3.3.2.1. Hospedeiros definitivos**

Os hospedeiros definitivos que adquirem *F. hepatica* são herbívoros que acidentalmente se alimentam de plantas contaminadas com as metacercárias <sup>(87)</sup>. Os principais hospedeiros definitivos deste trematode são ruminantes domésticos (Figura I 3.7 A-C), como ovinos, caprinos e bovinos <sup>(87,113)</sup>. Contudo, existem ainda hospedeiros que não são normalmente utilizados nas atividades domésticas, como burros, cavalos, mulas e até camelos (Figura I 3.7 D-G), e que podem igualmente ser infetados <sup>(113)</sup>. Não só estes hospedeiros, mas também animais selvagens e indígenas de regiões não endémicas, se tornaram hospedeiros definitivos de *F. hepatica* (Figura I 3.7 H-N), como búfalos, veados, javalis, marsupiais, coelhos, lebres, ratos, primatas <sup>(67,88,113)</sup> e até aves <sup>(50)</sup>.

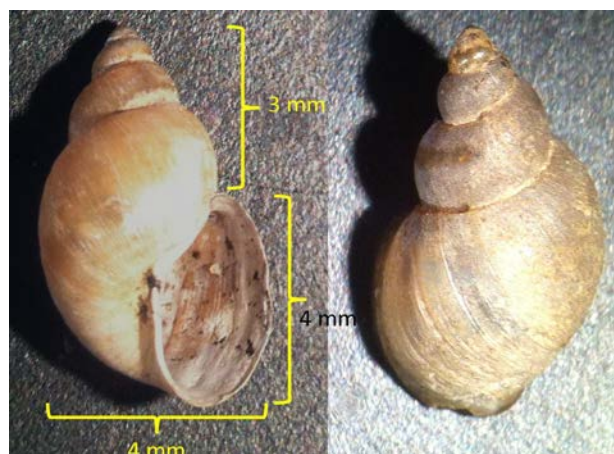


**Figura I 3.7.** Hospedeiros definitivos de *Fasciola* spp: produção pecuária (A-C), não-domésticos (D-G) e alguns selvagens (G-N). **A-** bovinos; **B-** ovinos; **C-** caprinos; **D-** burros; **E-** mulas; **F-** cavalos; **G-** camelos; **H-** búfalos; **I-** veados; **J-** alces; **L-** javalis; **M-** coelhos; **N-** ratos (adaptado de: imagens do Google)

A espécie *F. hepatica* tem o homem como hospedeiro definitivo acidental, que é afetado essencialmente devido aos seus hábitos alimentares, comportamentos e modo de vida, ocasionando em determinadas áreas a existência de infeção endémica humana <sup>(37,85)</sup>. O parasita pode sobreviver nos humanos até aos treze anos e meio <sup>(66)</sup>. Todavia, este tempo depende do hospedeiro definitivo portador do parasita adulto <sup>(66)</sup>, sendo demonstrado em diversos estudos que a longevidade média da espécie adulta de *F. hepatica* pode atingir desde, aproximadamente, quatro a treze anos <sup>(38)</sup>.

### 3.3.3.2.2. Hospedeiros intermediários

*F. hepatica* é um parasita que necessita de um hospedeiro intermediário para realizar a sua reprodução assexuada <sup>(31)</sup>. Os hospedeiros intermediários deste helminta são moluscos pulmonados dulçaquícolas, por isso conhecidos como caracóis de água doce <sup>(70)</sup>. Os hospedeiros intermediários susceptíveis para os miracídeos pertencem normalmente ao género *Lymnaea*, sendo a mais comumente afetada a espécie *Lymnaea truncatula*, sinónimo de *Galba truncatula* (Figura I 3.8). Trata-se de um molusco com origem na Europa mas que atualmente tem uma grande distribuição mundial, encontrando-se sobretudo em regiões de clima temperado <sup>(70,87)</sup>.



**Figura I 3.8.** *Lymnaea truncatula*, hospedeiro intermediário de *Fasciola hepatica* (cortesia de Ferreira, P. IHMT/UNL, 2012)

Existem outras espécies do género *Lymnaea* que também possuem uma ampla distribuição mundial, tendo aptidão para o parasita *F. hepatica*, como a espécie *Pseudosuccinea columella*, também considerada um hospedeiro intermediário de grande referência <sup>(67)</sup>, entre outras espécies <sup>(66,113)</sup>. A escolha do hospedeiro intermediário, além dos hospedeiros indígenas das regiões não endémicas, provém da ligação que este parasita estabelece com estes hospedeiros, sendo predominante para a escolha a ancestralidade dessa afinidade <sup>(66)</sup>.

As espécies do género *Lymnaea*, que transmitem a cercária de *F. hepatica*, divergem em determinadas características dos portadores de outros parasitas do género *Fasciola*, pois são espécies anfíbias que necessitam da alteração sazonal das regiões onde se encontram para a formação de *habitats* favoráveis à sua sobrevivência e para a disseminação da *Fasciola* <sup>(66,113)</sup>.

### 3.3.3.3. Ecologia

A dispersão de parasitas encontra-se relacionada com os locais onde o hospedeiro intermediário consegue sobreviver, por isso a parasitose e o parasita têm uma geografia que atinge várias altitudes, latitudes e coleções de água, podendo estas ser distintas na sua forma (desde pântanos a rios calmos), tipo (podendo ser de diversa natureza) e

duração (podendo ou não ser duradouras) <sup>(87,113)</sup>. Existe ainda a influência dos ecossistemas dos hospedeiros definitivos, pois estes hospedeiros são importantes para completar o ciclo de vida do parasita, como tal, ambos os ecossistemas – do hospedeiro intermediário e definitivo – têm de ser sobreponíveis <sup>(87)</sup>.

Os biótopos em que o molusco *L. truncatula* consegue sobreviver têm de ter determinadas características ambientais, sendo elas sobretudo a luz, a temperatura, a humidade e o solo <sup>(71,87,106)</sup>. O fator luz é importante para a sobrevivência do hospedeiro devido à influência que tem no crescimento da sua fonte alimentar (algas clorofíceas), que existem nos locais onde usualmente ele vive, como clareiras ou lugares com vegetação propícia à aquisição de luz <sup>(71)</sup>. O desenvolvimento do hospedeiro intermediário necessita de uma temperatura ótima (entre os 20°C e os 22°C) para ser realizado, de modo que, para um hospedeiro se fixar num determinado local, essa temperatura é indispensável <sup>(71)</sup>. A elevada humidade e consequente quantidade de água originam um aumento do ciclo parasitário, por isso a dispersão mundial desta doença existe principalmente em climas temperados e tropicais <sup>(87)</sup>.

O hospedeiro intermediário pode encontrar-se em qualquer tipo de solo, contudo tem uma preferência pelo solo argiloso, pois é aquele que possui as condições mais propícias <sup>(71)</sup>.

### 3.3.4. Interações parasita-hospedeiro

O sucesso da colonização dos hospedeiros por parte de *F. hepatica* e a sua duradoura permanência nestes provêm da capacidade do parasita de corromper, modular e escapar aos mecanismos de defesa do hospedeiro devido essencialmente aos produtos de excreção-secreção produzidos e utilizados pelo parasita aquando do seu deslocamento, bem como ao refúgio que os ductos biliares do hospedeiro proporcionam com consequente continuação do ciclo de vida do trematode <sup>(6,31,92)</sup>.

O sistema imunitário é a defesa que os hospedeiros (definitivos ou acidentais) têm perante parasitas como, por exemplo, *F. hepatica*, todavia este sistema é divergente entre hospedeiros, existindo idiosincrasias próprias dos mesmos perante este

parasitismo, como sucede com os bovinos, em que, após uma reinfeção, surgem resistências por parte destes, provocando a morte do parasita em poucos dias <sup>(50,77,87)</sup>. Nem todos os hospedeiros têm esta capacidade de resistir ao parasitismo por *F. hepatica*, como sucede com os ovinos e com os caprinos <sup>(50,77,87)</sup>.

As infeções provenientes do género *Fasciola* demonstram uma desregulação dos linfócitos T para a sua sobrevivência no hospedeiro, pois este género tenta alterar a resposta das células de defesa do hospedeiro, essencialmente as células Th1 e Th2, através da sua desregulação <sup>(6,7,77)</sup>. Este mecanismo evita a ocorrência de uma resposta imunitária impulsionada por Th1, resultando na sua opressão, e assim a resposta Th2 é mais evidenciada, pois impulsiona as células B a produzirem anticorpos para interagirem com os produtos excreção-secreção gerados pelo próprio parasita, permitindo a modelação e a evasão ao sistema imunitário <sup>(6,7,77)</sup>.

### 3.4. Manifestações clínicas

A Fasciolose é uma helmintose cujo quadro clínico é bastante díspar, não existindo nenhum sintoma exclusivo desta parasitose <sup>(38)</sup>. Esta pode ser dividida em duas fases: a fase aguda, em que se observam sintomas mais acentuados, ligados à ação do parasita até este atingir as células hepáticas, onde provoca malefícios; e a segunda fase, a crónica, que corresponde à presença do parasita nos ductos biliares e a todas as suas ações quando se encontra neste local, como a ocorrência de dores, obstruções e/ou inflamações <sup>(93)</sup>.

Na fase aguda desta parasitose, surgem sintomas como a elevação da temperatura corporal, problemas do foro gastrointestinal, exantemas, problemas respiratórios, hepatoesplenomegália, ascite, anemia e icterícia <sup>(114)</sup>. O quadro clínico mais característico desta fase caracteriza-se por: febre alternada, que pode chegar aos 40°C; hepatomegália com dores abdominais e diarreia; e eosinofilia<sup>2</sup> marcada <sup>(87,114)</sup>. Pode ocorrer fraca sintomatologia, ou a mesma ser inexistente, devido à entrada da fascíola nos ductos biliares <sup>(87,92,114)</sup>.

<sup>2</sup> Corresponde a uma resposta imunológica por parte dos eosinófilos a processos de invasão por organismos estranhos que podem provocar alergias ou doenças infecciosas <sup>(47)</sup>.

Por vezes, a fascíola provoca uma parasitose ectópica devido ao facto de o parasita se deslocar dentro do organismo do hospedeiro, podendo atingir outros órgãos e/ou tecidos, e promovendo outros quadros clínicos relacionados com essas localizações<sup>(92,114)</sup>. A morte do parasita nesses órgãos deixa vestígios nos tecidos<sup>(114)</sup>.

Na fase crónica pode ou não existir sintomatologia, devido sobretudo à obstrução e à inflamação dos órgãos onde o parasita se encontra a amadurecer, sendo as manifestações mais comuns: dor abdominal; indigestão; prisão de ventre e anorexia<sup>(87)</sup>. A evolução desta fase pode originar manifestações clínicas graves e comuns a outros problemas hepáticos, não permitindo a sua distinção e consequente tratamento<sup>(88,114)</sup>, originando, assim, complicações de maior severidade nos respetivos órgãos<sup>(114)</sup>, que posteriormente necessitam de ser tratados cirurgicamente, podendo até levar à morte do hospedeiro, apesar de, no Homem, a morte por esta parasitose ser pouco comum<sup>(87)</sup>. A possível ocorrência de infeções por bactérias origina geralmente maiores e diversificados quadros sintomatológicos<sup>(87,114)</sup>.

### 3.5. Diagnóstico laboratorial

A Fasciolose apresenta uma variedade de sinais e sintomas comuns a outras patologias, por isso existe uma grande dificuldade no diagnóstico desta parasitose e, consequentemente, esta doença não é equacionada na maioria das ocasiões face à referida sintomatologia<sup>(38)</sup>.

A Fasciolose humana é diagnosticada, principalmente, por análises coprológicas, que consistem na identificação e na quantificação parasitológica, especificamente dos ovos de *F. hepatica*, pesquisados diretamente nas fezes de pessoas com forte suspeita de infeção, sendo a melhor técnica de diagnóstico a técnica Kato-Katz<sup>(67,87,88,114)</sup>. Existem outras técnicas que permitem a observação da existência de ovos, e até do parasita maduro, no corpo do hospedeiro, todavia são práticas invasivas (aspirados, cirurgias, biópsias) nos doentes, principalmente nos órgãos onde a fascíola, ou os seus ovos, geralmente se encontram, mas também noutros órgãos que o parasita pode atingir<sup>(67)</sup>. A sensibilidade e a fiabilidade das técnicas envolvidas na procura desta fase do parasita são diminutas e podem não permitir um diagnóstico conclusivo, conforme a



periodicidade da postura durante a parasitose, originando uma reduzida ou mesmo ausência de ovos do parasita<sup>(60,67,87,88)</sup>.

Para auxiliar e melhorar o diagnóstico da Fasciolose, têm sido utilizados métodos imunológicos para uma análise mais precisa, com maior ênfase na fase da infeção, em que as técnicas de pesquisas de ovos não são tão eficientes (fase inicial); porém, também estes métodos possuem limitações próprias, como a ocorrência de reações cruzadas com outras parasitoses devido à baixa especificidade existente nestas técnicas<sup>(67,77,87)</sup>. Esta abordagem de diagnóstico indireto compreende diversas técnicas que podem ser utilizadas em amostras de soro, de sangue e de fezes para a deteção de anticorpos, antigénios, coproantigénios e imunocomplexos, todavia não existe uma técnica totalmente eficaz para o imunodiagnóstico da Fasciolose humana<sup>(61,67,77,92)</sup>. Atualmente, há a necessidade de realizar testes de rastreio e, consequentemente, testes confirmatórios (sendo os mais usuais os *immunoblots*), para o referido diagnóstico<sup>(92)</sup>.

Os exames imagiológicos são outras técnicas utilizadas na deteção e na monitorização da terapêutica da Fasciolose humana, através da demonstração de danos existentes nos diversos órgãos do hospedeiro sem o invadir<sup>(67,87,92)</sup>.

Como já referido, o diagnóstico da Fasciolose é realizado pelas técnicas coprocológicas e serológicas, porém, para a definição da fase em que o paciente se encontra face à parasitose, são necessárias técnicas imagiológicas (sendo que só na fase crónica existem manifestações físicas nos órgãos), assim como o conhecimento do período temporal em que se exterioriza a parasitose no paciente (conforme a fase aguda, na qual existe sintomatologia diversa num curto período de tempo – inferior a quatro meses –, contrariamente ao que acontece na fase crónica)<sup>(93)</sup>.

### **3.5.1. Diagnóstico diferencial entre duas espécies de *Fasciola***

*Fasciola hepatica* e *F. gigantica* são as duas espécies principais implicadas na Fasciolose humana, contudo são duas espécies distintas que necessitam de ser diferenciadas, devido à parasitose que originam, o que só é possível através de estudos

moleculares e morfológicos nos parasitas adultos <sup>(81)</sup>, sendo as técnicas usuais de diagnóstico da Fasciolose ineficazes para esta diferenciação <sup>(59,67,81)</sup>.

Os estudos morfológicos permitem a distinção das duas espécies, contudo as diversas pressões que os parasitas sofrem, principalmente nas suas características anatómicas, constituem um obstáculo neste método de diagnóstico diferencial <sup>(59,68,91)</sup>.

A análise molecular é considerada a metodologia mais eficaz na distinção/identificação de *F. hepatica* versus *F. gigantica* devido à sua eficiência, rapidez, facilidade de execução e fiabilidade, sendo as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), Reação em Cadeia da Polimerase – Amplificação Aleatória do ADN Polimórfico (PCR-RAPD) e Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo da Conformação de Cadeia Simples (PCR-SSCP) as que evidenciam melhor essas características e, como tal, as mais utilizadas, porém é essencialmente o PCR-RFLP que tem sido mais usado em diversos estudos, amplificando os genes 28S e 18S ARNr, e as regiões *ITS-1* e *ITS-2*, apesar da necessidade de diversos enzimas, do tempo e dos consumíveis que esta técnica exige <sup>(4,59,68,91)</sup>. A técnica de PCR-RAPD tem tido bastante êxito neste tipo de diagnóstico, contudo existem desvantagens na sua utilização, como a fácil contaminação e a fraca reprodutibilidade <sup>(68)</sup>. Para estes métodos moleculares, no diagnóstico distintivo de espécies, tem sido utilizado com maior enfoque o ADN<sub>r</sub>, especificamente as regiões *ITS-1* ou *ITS-2*, contudo ambas são regiões genéticas importantes nestes parasitas para os diversos estudos moleculares <sup>(4,59,84)</sup>.

### 3.5.2. Testes serológicos

Os testes serológicos são utilizados no imunodiagnóstico para a deteção precoce (fase aguda) da Fasciolose, bem como um apoio no diagnóstico da fase crónica <sup>(61,92)</sup>.

Os antígenos usualmente utilizados nos testes serológicos para a identificação desta helmintose encontram-se em circulação no hospedeiro: o antígeno somático, ou total, o antígeno de superfície e o antígeno excretor-secretor (ES), originário dos produtos que o parasita *F. hepatica* produz <sup>(61,94)</sup>. Para a realização destes testes, a escolha do

antigénio ES é mais usual por obter resultados superiores comparativamente com os outros antigénios <sup>(61,94)</sup>.

Existem diversas técnicas imunológicas, contudo é extremamente importante ter em conta a respetiva sensibilidade e especificidade para verificar qual a técnica que demonstra melhores resultados e que, conseqüentemente, é a mais adequada para o diagnóstico <sup>(61)</sup>. Além das referidas características, também existe a necessidade de verificar a existência de reatividade, nos exames, entre a Fasciolose e outras parasitoses, como a schistosomose, a toxocariose, a filariose ou a ascariose <sup>(87,92)</sup>.

São inúmeras as técnicas de imunodiagnóstico serológico da Fasciolose, como Imunofluorescência Indireta (IFI), Teste Indireto de Anticorpos Fluorescentes (IFAT), *Counter-electrophoresis* (CEP), Ensaio de Hemaglutinação Indireta (IHA), Imunoperoxidase (IP) e Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA), além das suas derivadas, como Ensaio de Rastreio em Falcon – Ensaio de Imunoabsorção enzimática (FAST-ELISA), dot blot-ELISA, ELISA *sandwich* e *inhibition* ELISA <sup>(87,92,94)</sup>. Apesar desta diversidade, a escolha do principal teste serológico para o imunodiagnóstico em humanos é ainda discordante, <sup>(61)</sup> por isso, atualmente, a técnica ELISA é a mais utilizada como técnica de rastreio <sup>(92)</sup>, e têm sido empregues as técnicas Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot* (WB), devido à existência de uma fraca reatividade com outras parasitoses, para efetuar a confirmação dos testes serológicos <sup>(94)</sup>.

### 3.6. Tratamento, prevenção e controlo

O tratamento considerado mais apropriado para a Fasciolose humana é a administração de triclabendazole, que atua em qualquer fase da doença <sup>(92)</sup>, bem como nos diferentes estádios do parasita *F. hepatica* no hospedeiro definitivo <sup>(95)</sup>. Este fármaco foi inicialmente formulado para o tratamento animal, porém, em 1989, iniciou-se a sua utilização no tratamento da Fasciolose humana <sup>(92,95)</sup>.

O Homem, para não contrair a Fasciolose, necessita de medidas preventivas, como a proteção de plantas de consumo alimentar, através de instalações agrícolas próprias; a

eliminação do agrião selvagem dos seus hábitos alimentares; e a proteção da água de consumo, principalmente nas áreas endémicas <sup>(87)</sup>.

Perante a existência de Fasciolose, é necessário atuar com vista ao seu controlo, com o intuito de prevenir a infeção dos humanos pelo parasita, através da alteração do modo de preparar os alimentos; do tratamento de gado infetado com o parasita; do aquecimento prévio da água de consumo humano; da supressão do hospedeiro intermediário; do melhoramento do saneamento básico <sup>(92)</sup>; e da administração de terapêutica, especialmente em crianças, devido ao facto de estas geralmente representarem a população mais afetada nas áreas onde existe o parasita <sup>(88)</sup>.

**PARTE II – Interações  
imunológicas no  
polimorfismo do quadro  
clínico de doentes de São  
Miguel (Açores)**

# **1. INTRODUÇÃO AO ESTUDO**

Os quadros clínicos apresentados aquando da suspeita de Leptospirose podem apontar para inúmeras patologias, sendo uma delas a Fasciolose. Ambas as patologias, além de clinicamente similares, também têm semelhanças relativamente aos hospedeiros/reservatórios e às condições edafoclimáticas das regiões onde normalmente se encontram.

Na ilha de São Miguel (Açores), estão reunidas todas as condições necessárias para a sobrevivência dos agentes etiológicos quer da Leptospirose quer da Fasciolose, *Leptospira interrogans* e *Fasciola hepatica*, respetivamente, proporcionando uma grande dispersão da bactéria e do parasita, bem como a presença de um grande endemismo destas patologias, principalmente da Leptospirose, a qual já se encontra bem estudada, tratada e controlada. Por sua vez, a investigação da Fasciolose, apesar de igualmente endémica, é atualmente quase inexistente, sobretudo em humanos, além de que não é uma doença de declaração obrigatória, não permitindo observar a evolução desta patologia, bem como os doentes afetados por ela. Como tal, os objetivos específicos desta investigação foram:

- Pesquisar, através de um teste de rastreio, anticorpos anti-*F. hepatica* em amostras serológicas previamente estudadas no âmbito da Leptospirose e que apresentaram resultados positivos ou inconclusivos para a referida patologia;
- Utilizar uma técnica de referência da Fasciolose para a confirmação dos resultados inicialmente obtidos;
- Comparar os quadros clínicos (sinais e sintomas) de ambas as patologias;
- Analisar a sociodemografia e a clínico-epidemiologia dos doentes envolvidos no estudo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**



## 2.1. População-alvo e critérios de inclusão

A população-alvo é constituída por um total de 280 amostras de soro correspondentes a igual número de doentes (239♂ e 41♀) provenientes da ilha de São Miguel (Açores). Os critérios de inclusão para a seleção das referidas amostras no estudo foram: *i*) indivíduos que recorreram ao Hospital do Divino Espírito Santo, em Ponta Delgada (HDESPD), com suspeição clínica e/ou epidemiológica de Leptospirose; *ii*) a primeira amostra de soro obtida após os primeiros sintomas; e *iii*) amostras obtidas no período de 2005-2010. Estes soros foram previamente analisados pela técnica de referência para a Leptospirose (TAM), no Laboratório de Leptospirose e Borreliose de Lyme (Laboratório de referência), do Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa (IHMT – UNL), permanecendo posteriormente na seroteca do respetivo laboratório. A TAM permitiu verificar a presença/ausência de anticorpos anti-*Leptospira interrogans* s.l. De acordo com os resultados então obtidos para a Leptospirose, a amostragem agora considerada para o estudo da Fasciolose incluiu 83 soros com resultado positivo, 73 com resultado inconclusivo e 124 com resultado negativo (Tabela 1). Estes últimos foram analisados também pela técnica micro-ELISA, como amostra-controlo. Cada amostra de soro é sempre acompanhada por uma ficha de inquérito que permite registar os dados sociodemográficos e clínico-epidemiológicos dos respetivos doentes (*Anexo I*).

**Tabela 1.** Distribuição dos doentes/soros *versus* diagnóstico laboratorial para Leptospirose (TAM).

	Serorreatividade para a Leptospirose			Total N (%)
	Negativos n (%)	Positivos n (%)	NC n (%)	
N.º de doentes/soros	124 (44,3)	83 (29,6)	73 (26,1)	280 (100,0)

NC – inconclusivo

### 2.1.1. Antígenos (*Fasciola hepatica*)

Utilizou-se o antígeno total (AgT) dos parasitas adultos de *F. hepatica* e o antígeno deslipidizado (AgD) do referido parasita. Estes antígenos encontram-se conservados a

-20°C, apresentando uma concentração de proteínas de 2030 microgramas de proteína por mililitro ( $\mu\text{g/P/ml}$ ) e 1280  $\mu\text{g/P/ml}$  para o *AgT* e o *AgD*, respetivamente, e foram preparados em meados da década de 90, com base em protocolos otimizados na atual Unidade de Ensino e Investigação em Parasitologia Médica – Grupo de Helminologia e Malacologia Médicas (UEIPM – GH&MM).

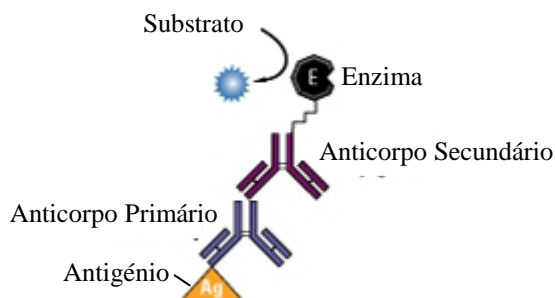
## 2.2. Métodos

Para a deteção da presença de anticorpos anti-*F. hepatica*, os soros selecionados foram analisados por técnicas serológicas, como a técnica micro-*Enzyme Linked Immunosorbent Assays* (micro-ELISA), que é considerada a técnica de rastreio no imunodiagnóstico desta parasitose. Posteriormente, procedeu-se à técnica de Imunoeletrodifusão (IED) – técnica de confirmação, utilizando-se os mesmos antígenos da técnica micro-ELISA.

Para aumentar a especificidade em ambas as técnicas, os soros foram testados tanto com *AgT* como com *AgD*. Paralelamente, foram incluídos soros-controlo que consistiam num grupo de soros com serodiagnóstico positivo ( $n_{\text{micro-ELISA}}=2$ ;  $n_{\text{IED}}=1$ ) e negativo ( $n_{\text{micro-ELISA}}=4$ ;  $n_{\text{IED}}=0$ ) para *F. hepatica*.

### 2.2.1. Pesquisa de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos – micro-ELISA

O teste de micro-ELISA permite a deteção de anticorpos específicos presentes numa amostra (por exemplo, soro), através de antígenos e anticorpos conjugados com enzimas de forma a detetar os seus homólogos nas amostras “problema”. Após ocorrer uma reação antígeno-anticorpo, o anticorpo secundário conjugado com o enzima vai reagir com o substrato, resultando no aparecimento de cor (Figura II 2.1). Os resultados obtidos são quantificados por espectrofotometria e comparados com os valores-padrão<sup>(14)</sup>.

**Figura II 2.1.** Representação esquemática da técnica micro-ELISA

(adaptado de: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=F88ADEC9-1B43-4585-922E-836FE09D8403>)

O protocolo de micro-ELISA em uso na UEIPM – GH&MM tem por base o método de Voller (1996), com algumas alterações.

Esta técnica foi aplicada aos soros “problema” para a deteção de uma possível reatividade entre os antígenos utilizados e os anticorpos anti-*F. hepatica* presentes nas referidas amostras.

A técnica de micro-ELISA consiste nos seguintes passos:

#### I. Sensibilização das placas

- Prepararam-se as diluições dos antígenos em Solução de Tampão Carbonato pH 9,6 (Tabela 2), partindo-se de concentrações conhecidas dos antígenos (2 µg/P/ml para o AgT e 4 µg/P/ml para o AgD).

**Tabela 2.** Reagentes para a preparação da Solução Tampão Carbonato.

Solução Tampão Carbonato pH 9,6	Reagentes	Quantidades		
	NaHCO <sub>3</sub>	2,1 g	500 ml, Acertou-se o pH (pH 8,0)	±354 ml
	H <sub>2</sub> O d.	500 ml		500 ml
	NaCO <sub>3</sub>	2,65 g	500 ml, Acertou-se o pH (pH 11,2)	±146 ml
	H <sub>2</sub> O d.	500 ml		Acertou-se o pH

- Procede-se à sensibilização das microplacas de fundo plano (Figura II 2.2) com os antígenos diluídos colocando-se 100 µl por poço, em placas distintas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura II 2.2.** Esquema representativo de uma microplaca.  
(esquema original do autor)

- Incubam-se as placas a 37°C durante 30 minutos.
- Após incubação, as placas são colocadas a 4°C, durante a noite.
- Prepara-se a solução *stock* do Tampão Fosfato 0,5M, seguida da solução Tampão PBS/Tween® 0,05% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Reagentes para a preparação da Solução *stock* Tampão Fosfato 0,5M, Soro Fisiológico 9‰ e Solução Tampão PBS/Tween® 0,05%.

		Reagentes		Quantidade			
Solução Tampão PBS/Tween® 0,05%	Tampão PBS 0,01M	Solução Tampão	<i>stock</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	25,5 g	500ml	20ml  1000ml
		Fosfato		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *	9,65 g	Acertou- -se o pH	
		0,5M pH 7,2		H <sub>2</sub> O d.	500ml		
		Soro Fisiológico	NaCl	9 g	1000ml	980ml	
		9‰	H <sub>2</sub> O d.	1000ml			
	Tween® (Sigma)			0,5ml			

\*anidro

- Posteriormente ao período de incubação, retira-se o antígeno diluído e lavam-se as placas com 200 µl de tampão PBS/Tween® 0,05% por poço durante 5 minutos (4 vezes).

- As reações são então bloqueadas através de uma Solução Albumina Bovina a 2% (BSA) (Tabela 4) diluída em tampão PBS/Tween® 0,05%, durante 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente.

**Tabela 4.** Reagentes para a preparação da Solução Albumina Bovina 2%.

	Reagentes	Quantidade
BSA 2%	Albumina Bovina	2 g
	Solução Tampão Fosfato 0,5M	100 ml

- Proceda-se às lavagens como anteriormente descrito.

## II. Adição do soro “problema”

- Os soros são diluídos em tampão PBS/Tween® [1/200 (IgM) e 1/400 (IgG)].
- Colocam-se 100 µl de cada diluição por poço, em placas distintas e previamente sensibilizadas para *AgT* e *AgD*, com incubação à temperatura ambiente, durante 2 horas.
- As placas permanecem a 4°C durante a noite.
- Proceda-se às lavagens como descrito anteriormente.

## III. Adição do substrato específico e do conjugado

- Efetuam-se as diluições das imunoglobulinas marcadas com peroxidase (Sigma®) [1/50 000 (anti-IgM humana) e 1/40 000 (anti-IgG humana)], em tampão PBS/Tween®.
- Colocam-se 100 µl de cada diluição por poço, em placas distintas e previamente sensibilizadas para *AgT* e *AgD*, com incubação à temperatura ambiente, durante 1 hora e 30 minutos.
- Proceda-se às lavagens como descrito anteriormente.
- Prepara-se a solução *stock* de Tampão Substrato pH 5,5 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Reagentes para a preparação da Solução Tampão Substrato.

	Reagentes	Quantidade	
Solução Tampão Substrato pH 5,5	Tampão Solução Tampão Fosfato	100 ml	500 ml
	PBS 0,1M 0,5M		
	Soro Fisiológico 9‰	400 ml	400 ml
	Tampão Ácido cítrico 0,1M	4,2 g	200 ml
	Citrato H <sub>2</sub> O d.	200 ml	100 ml

*Acertou-se o pH*

- Seguidamente é preparado o substrato cromogénico com 18 mg de Ortofenildiamina-OPD (Sigma<sup>®</sup>), 50 ml de Solução Tampão Substrato pH 5,5 e 50 µl de peróxido de hidrogénio (30% v/v), colocando-se 100 µl deste substrato por poço.
- Estas placas são imediatamente cobertas com papel de alumínio e colocadas ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos.
- As reações são finalizadas pela adição de 50 µl de ácido clorídrico (HCl 2N) por poço.
- As absorvências são lidas no espectrofotómetro (Anthos 2020<sup>®</sup>), no comprimento de onda de 492 nm.

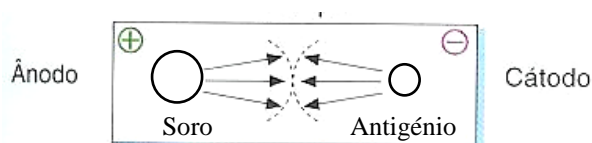
Das absorvências determinadas, as amostras de soro foram consideradas positivas quando o valor destas se encontrava acima do *cut-off*. Este valor de referência foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\bar{X} + 3 SD$$

onde  $\bar{X}$  é a média das absorvências dos controlos negativos e **SD** é o desvio-padrão das mesmas.

### 2.2.2. Pesquisa de anticorpos e de antígenos por Imunoeletrodifusão – IED

A técnica de Imunoeletrodifusão (IED) permite observar a formação do complexo antígeno-anticorpo através da coloração. Este processo é realizado numa membrana de gelose que possibilita a migração dos anticorpos e antígenos, quando aplicada uma corrente elétrica. Neste sistema, os anticorpos migram do polo positivo (ânodo) para o polo negativo (cátodo) enquanto o antígeno migra em sentido inverso (Figura II 2.3). Quando ambos hibridam, só ocorre o aparecimento de bandas de precipitação se houver formação do referido imunocomplexo <sup>(14)</sup>.



**Figura II 2.3.** Imagem representativa da migração do soro-antígeno na técnica IED. (adaptado de Burmester & Pezzutto, 2005 <sup>(14)</sup>)

O protocolo utilizado pela UEIPM – GH&MM foi otimizado por Rombert e Trinca (1976).

A técnica IED confirma os resultados positivos e alguns inconclusivos obtidos anteriormente pela técnica micro-ELISA, evidenciando ainda mais a reatividade entre anticorpos, se presentes no soro, e os antígenos de *F. hepatica*.

A técnica IED consiste nos seguintes passos:

#### **I. Preparação das lâminas**

- Cada lâmina utilizada nesta técnica é previamente revestida com uma fina camada de gel de agarose.
- É preparada uma gelose (1-1,5%) por dissolução de 1 g a 1,5 g de agarose em 100 ml de tampão veronal pH 8,2 (Tabela 6).

**Tabela 6.** Reagentes para a preparação da Solução Tampão Veronal.

Solução Tampão Veronal pH 8,2*	Reagentes	Quantidade
	Barbital de Sódio	8,5 g
	Ácido Clorídrico (HCl 1N)	8,9 ml
	H <sub>2</sub> O d.	até 1 000 ml

\*Acertou-se o pH

- Pipetam-se 3 ml em cada lâmina, preenchendo-a completa e uniformemente.
- As lâminas são colocadas numa câmara húmida a 4°C, para a estabilização e a solidificação da gelose.
- Após polimerização da gelose, abrem-se pequenas cavidades (poços) com diâmetro de 4 mm e 2 mm para o soro e o antigénio, respetivamente.

## II. Colocação das amostras nas lâminas

- Colocam-se aproximadamente 20 µl e 10 µl dos soros e antigénios, respetivamente, evitando-se extravasar.
- Colocam-se as lâminas num suporte da tina de eletroforese (Pharmacia®) com tampão veronal.
- Estabelece-se a ligação entre lâminas e o tampão veronal através de papel de filtro (Whatman® n.º 1 ou equivalente), previamente cortado na dimensão da lâmina, possibilitando a passagem de corrente elétrica (200 V) durante 45 minutos.
- Após este tempo as lâminas são colocadas numa câmara húmida à temperatura ambiente, durante a noite.

## III. Lavagem das lâminas

- Posteriormente, as lâminas são imersas na solução de citrato de sódio a 5% (Tabela 7) durante 1 hora, para retirar as proteínas inespecíficas.



**Tabela 7.** Reagentes para a preparação da Solução Citrato de Sódio 5%.

	Reagentes	Quantidade
Citrato de Sódio 5%	Citrato de sódio	5 g
	H <sub>2</sub> O d.	1 000 ml

- De seguida, as lâminas são lavadas numa solução de soro fisiológico durante a noite, a 4° C.

#### IV. Desmineralização e secagem das lâminas

- As lâminas são então envolvidas em papel de filtro (Whatman® n.º 1 ou equivalente) previamente embebido em água destilada, e colocadas à temperatura ambiente até o papel de filtro secar.

#### V. Coloração das lâminas

- A coloração das lâminas é feita utilizando uma solução corante “negro de amido” (Tabela 8) durante 2 a 5 minutos.

**Tabela 8.** Reagentes para a preparação da Solução negro de amido.

	Reagentes	Quantidade
Solução negro de amido	Negro de amido	0,1 g
	Metanol	50 ml
	Ácido acético	10 ml
	H <sub>2</sub> O d.	40 ml

- Retira-se o corante em excesso.
- Posteriormente, adiciona-se solução descorante negro de amido (Tabela 9) até ao desaparecimento do corante nas lâminas. Depois deste procedimento, as lâminas ficam a secar ao ar.

**Tabela 9.** Reagentes para a preparação da Solução descorante do negro de amido.

	Reagentes	Quantidade
Solução descorante negro de amido	Metanol	500 ml
	Ácido acético	100 ml
	H <sub>2</sub> O d.	400 ml

O critério de positividade para esta técnica traduz-se pelo aparecimento de uma ou mais bandas entre os poços soro-antigénio.

### 2.2.3. Análise estatística

A análise clínico-epidemiológica, sociodemográfica e estatística inerente à interação imunológica entre a Leptospirose e a Fasciolose foi realizada com apoio de bases de dados (*Access*, *Excel Microsoft Office* versão 2010) preparadas propositadamente para este estudo. Foi ainda utilizado o programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 20.

Nas amostras estudadas utilizaram-se testes para a determinação de diferenças significativas para um nível de significância de 5%. O teste que se adotou para o tratamento estatístico foi o Qui-Quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ), para averiguar se existiam diferenças significativas na resposta imunológica para as seguintes variáveis qualitativas: faixa etária, género, formas de transmissão e quadros clínicos. Aplicou-se o teste  $\chi^2$  para os dados recolhidos, provenientes de variáveis qualitativas, organizados sob a forma de tabela de contingência. Previamente, verificaram-se as condições de aplicabilidade deste teste, que consistem na presença de frequências esperadas maiores que cinco (tabelas de 2x2) ou na existência de menos de 20% de células com frequências esperadas inferiores a cinco (tabelas de outras dimensões) <sup>(40)</sup>, o que, de acordo com alguns autores, ainda permite o bom desempenho do teste. Quando estas condições não se verificam, utiliza-se em alternativa o Teste Exato de Fisher. Foi ainda realizada a correção de Bonferroni para a variável “quadro clínico” de modo a ajustar o nível de significância, como descrito previamente por alguns autores <sup>(58)</sup>, para evitar o

aparecimento de diferenças significativas erróneas quando da utilização de K testes estatísticos não independentes, onde K é o número de testes da variável quadro clínico  $\left(\frac{\alpha}{K}\right)$ .

Para a comparação das técnicas, TAM e micro-ELISA, utilizou-se o teste McNemar-Bowker para dados emparelhados categorizados em três classes: negativos, positivos e inconclusivos.

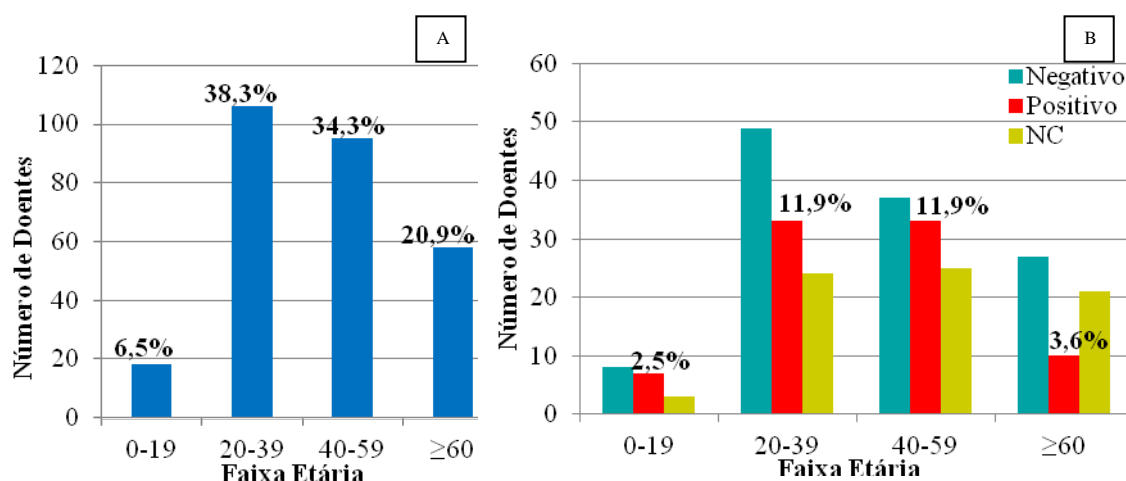
Para averiguar a existência de diferenças significativas nos níveis séricos da IgM e IgG anti-*F. hepatica*, nos dois antigénios total e deslipidizado, para os três grupos de indivíduos com resultado positivo, negativo e inconclusivo pela TAM, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar múltiplos grupos independentes<sup>(58)</sup>. Foram ainda utilizadas as comparações múltiplas quando se verificaram diferenças significativas.

### **3. RESULTADOS**

### 3.1. Comparação sociodemográfica e clínico-epidemiológica da amostra populacional *versus* resultados da TAM

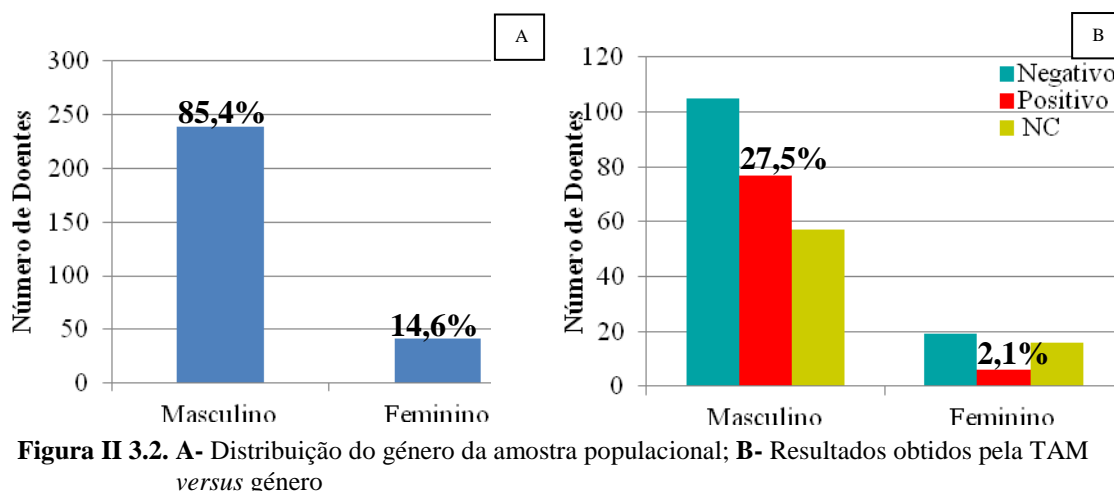
Cada amostra de soro do total estudado (N=280) foi obtida de igual número de indivíduos/doentes da ilha de São Miguel, e foi acompanhada pelo respetivo inquérito epidemiológico (*Anexo 1*), no qual se incluem diversas variáveis sociodemográficas (faixa etária, género, profissão/ocupação), bem como as possíveis fontes de transmissão dos agentes causais (Leptospirose, no caso) e a presença/ausência de manifestações clínicas que constituíram os critérios *major* utilizados neste estudo. Dos 280 soros, previamente analisados no âmbito do diagnóstico laboratorial da Leptospirose, 83 (29,6%) revelaram a presença de aglutininas anti-*L. interrogans* s.l. pela TAM (técnica de referência) [*vide* Tabela 1 *in* Material e Métodos].

Em relação aos grupos etários, é de salientar que três dos inquéritos epidemiológicos não tinham indicação de idade, pelo que os dados referentes a esta variável são apenas de 277 indivíduos, sendo que o maior número de doentes com quadro clínico compatível com Leptospirose corresponde à faixa etária entre os 20 e os 39 anos (n=106; 38,3%) (Figura II 3.1 A). Em relação à prevalência dos indivíduos com resultado positivo, o grupo etário dos 20 aos 59 anos (66<sup>+</sup>/277; 23,8%) foi o predominante, não tendo sido observadas diferenças significativas ( $\chi^2$ ;  $P=0,206$ ) entre os diferentes grupos etários quando comparados entre si (Figura II 3.1 B).



**Figura II 3.1.** A- Distribuição etária dos doentes de acordo com sintomatologia compatível com Leptospirose; B- Resultados obtidos pela TAM *versus* faixa etária

A avaliação pela TAM mostrou também que o género masculino foi o mais afetado, com 77 casos registados (77<sup>+</sup>/280; 27,5%) (Figura II 3.2), verificando-se diferenças significativas ( $\chi^2$ ;  $P=0,034$ ) quando comparado com o género feminino.



Relativamente à atividade profissional, apenas 200 indivíduos tinham inquéritos completos. A profissão/ocupação “Lavrador” foi a mais representada, com 45 indivíduos (22,5%). Quando relacionada esta variável com os resultados da TAM, verificou-se que a maior prevalência para a Leptospirose coube aos lavradores (24<sup>+</sup>/200; 12,0%) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Distribuição dos doentes com suspeita/confirmação de Leptospirose por profissão/ocupação.

Profissão/ Ocupação	N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Leptospirose		
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)
Lavrador	45 (22,5)	14 (7,0)	24 (12,0)	7 (3,5)
Reformado	24 (12,0)	8 (4,0)	8 (4,0)	8 (4,0)
Pedreiro	22 (11,0)	12 (6,0)	7 (3,5)	3 (1,5)
Domésticos	15 (7,5)	6 (3,0)	3 (1,5)	6 (3,0)
Agricultor	13 (6,5)	2 (1,0)	9 (4,5)	2 (1,0)
Outras	81 (40,5)	40 (20,0)	18 (9,0)	23 (11,5)
N <sup>Total</sup>	200 (100)	82 (41,0)	69 (34,5)	49 (24,5)

NC – inconclusivo

Quanto às potenciais fontes de transmissão de leptospirosas, nestes doentes, os resultados dos inquéritos (n=258) mostraram que 149 (57,8%) indivíduos tiveram contacto com roedores e 112 (43,4%) com canídeos, sendo estes os principais veículos dos agentes causais da Leptospirose nos doentes que apresentavam um quadro clínico compatível com a referida doença. Porém, atendendo à fonte de transmissão associada à seropositividade, o contacto com roedores esteve presente em 49 (32,9%) dos doentes com resultado positivo, sendo que 37 (44,6%) tiveram contacto com bovinos e 36 (32,1%) contactaram com canídeos. Nos bovinos verificaram-se diferenças significativas quando se estabeleceu a associação causa-efeito (Tabela 11).

**Tabela 11.** Distribuição do número de doentes pelas fontes de transmissão *versus* resultados da TAM.

Fontes de transmissão		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Leptospirose			P <sub>(χ²)</sub>
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Roedores	P	149 (57,8)	63 (42,3)	49 (32,9)	37 (24,8)	0,688**
	A	109 (42,2)	45 (41,3)	32 (29,4)	32 (29,4)	
Canídeos	P	112 (43,4)	45 (40,2)	36 (32,1)	31 (27,7)	0,890**
	A	146 (56,6)	63 (43,2)	45 (30,8)	38 (26,0)	
Bovinos	P	83 (32,2)	30 (36,1)	37 (44,6)	16 (19,3)	0,006*
	A	175 (67,8)	78 (44,6)	44 (25,1)	53 (30,3)	
Água	P	66 (25,6)	28 (42,4)	24 (36,4)	14 (21,2)	0,423**
	A	192 (74,4)	80 (41,7)	57 (29,7)	55 (28,6)	
Suínos	P	32 (12,4)	13 (40,6)	9 (28,1)	10 (31,2)	0,813**
	A	226 (87,6)	95 (42,0)	72 (31,9)	59 (26,1)	
Outros animais	P	66 (25,6)	25 (37,9)	18 (27,3)	23 (34,8)	0,224**
	A	192 (74,4)	83 (43,2)	63 (32,8)	46 (24,0)	

NC – inconclusivo; P – Presença; A – Ausência; \*Existência de diferenças significativas; \*\* Ausência de diferenças significativas

Os principais quadros clínicos, observados aquando da consulta médica (Serviço de Urgência) de 265 dos doentes, dos quais se dispôs de inquérito epidemiológico preenchido, apresentavam: febre (234/265; 88,3%), mialgias (201/265; 75,8%), cefaleias (162/265; 61,1%) e síndrome gripal (125/265; 47,2%). Na avaliação analítica dos doentes, verificou-se elevação de transaminases (TGO/TGP) em 175 (66%), leucocitose

em 155 (58,5%), e ainda 143 (54%) apresentavam fosfatase alcalina/gama glutamiltransferase (FA/ $\gamma$ GT) elevada (Tabela 12).

Relativamente ao quadro clínico associado à seropositividade para Leptospirose, observou-se que os sinais e sintomas anteriormente referidos corresponderam também, e pela mesma ordem, ao maior número de casos positivos, o mesmo se verificando para a avaliação analítica (Tabela 12).

**Tabela 12.** Sinais e sintomas clínicos compatíveis com Leptospirose *versus* resultados da TAM.

Manifestações/Quadro clínico		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Leptospirose			$P_{(z^2)}^{(a)(b)}$
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Febre	P	234 (88,3)	98 (41,9)	78 (33,3)	58 (24,8)	0,151**
	A	31 (11,7)	16 (51,6)	5 (16,1)	10 (32,3)	
Mialgias	P	201 (75,8)	86 (42,8)	66 (32,8)	49 (24,4)	0,562**
	A	64 (24,2)	28 (43,8)	17 (26,6)	19 (29,7)	
Cefaleias	P	162 (61,1)	67 (41,4)	56 (34,6)	39 (24,1)	0,354**
	A	103 (38,9)	47 (45,6)	27 (26,2)	29 (28,2)	
Quadro gripal	P	125 (47,2)	50 (40,0)	45 (36,0)	30 (24,0)	0,300**
	A	140 (52,8)	64 (45,7)	38 (27,1)	38 (27,1)	
Náuseas	P	75 (28,3)	30 (40,0)	23 (30,7)	22 (29,3)	0,675**
	A	190 (71,7)	84 (44,2)	60 (31,6)	46 (24,2)	
Tosse	P	70 (26,4)	25 (35,7)	23 (32,9)	22 (31,4)	0,289**
	A	195 (73,6)	89 (45,8)	60 (30,8)	46 (23,6)	
Vómitos	P	60 (22,6)	24 (40,0)	20 (33,3)	16 (26,7)	0,863**
	A	205 (77,4)	90 (43,9)	63 (30,7)	52 (25,4)	
Icterícia	P	48 (18,1)	13 (27,1)	22 (45,8)	13 (27,1)	0,024** <sup>(b)</sup>
	A	217 (81,9)	101 (46,5)	61 (28,1)	55 (25,3)	
Odinofagia	P	43 (16,2)	27 (62,8)	8 (18,6)	8 (18,6)	0,016** <sup>(b)</sup>
	A	222 (83,8)	87 (39,2)	75 (33,8)	60 (27,0)	
Conjuntivite	P	41 (15,5)	20 (48,8)	14 (34,1)	7 (17,1)	0,388**
	A	224 (84,5)	94 (42,0)	69 (30,8)	61 (27,2)	
Dispneia	P	30 (11,3)	10 (33,3)	14 (46,7)	6 (20,0)	0,157**
	A	235 (88,7)	104 (44,3)	69 (29,4)	62 (26,4)	



(Continuação Tabela 12)

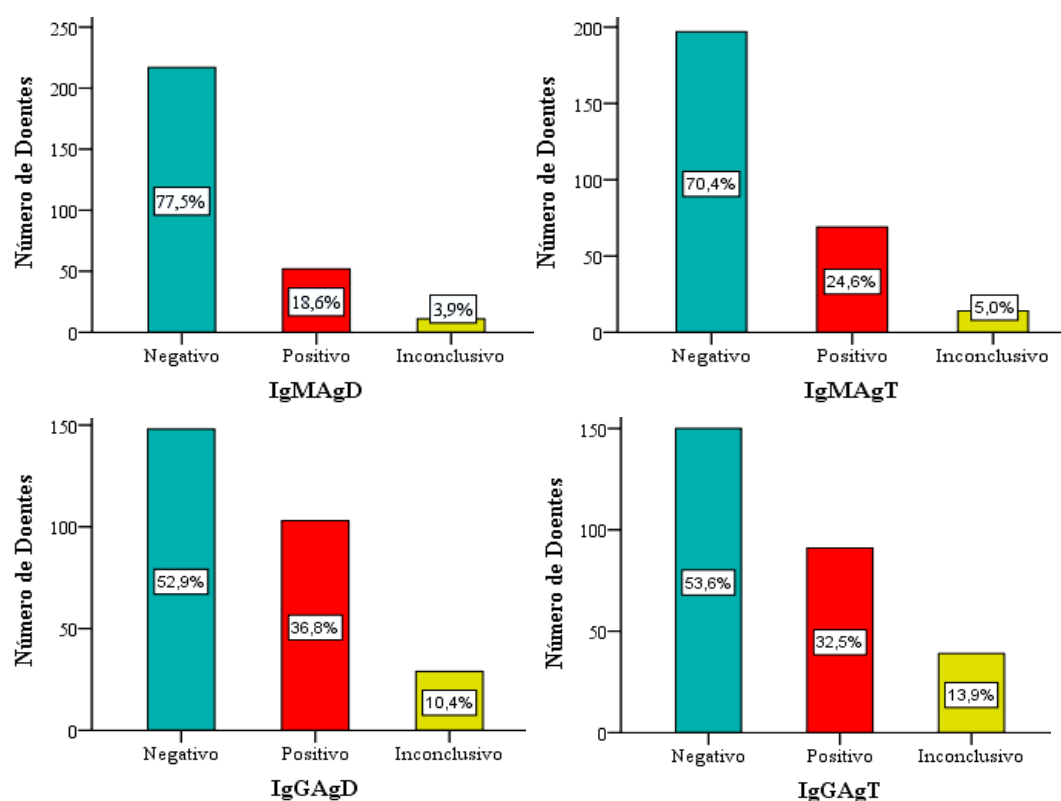
Manifestações/Quadro clínico		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Leptospirose			$P_{(72)}^{(a)(b)}$
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Diarreia	P	16 (6,0)	9 (56,2)	5 (31,2)	2 (12,5)	0,398**
	A	249 (94,0)	105 (42,2)	78 (31,3)	66 (26,5)	
Hemoptises	P	11 (4,2)	1 (9,1)	10 (90,9)	0 (0,0)	>0,001** <sup>(a)(b)</sup>
	A	254 (95,8)	113 (44,5)	73 (28,7)	68 (26,8)	
Petéquias	P	9 (3,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	4 (44,4)	0,320** <sup>(a)</sup>
	A	256 (96,6)	112 (43,8)	80 (31,2)	64 (25,0)	
Hemorragia das mucosas	P	8 (3,0)	1 (12,5)	5 (62,5)	2 (25,0)	0,121** <sup>(a)</sup>
	A	257 (97,0)	113 (44,0)	78 (30,4)	66 (25,7)	
Meningismo	P	3 (1,1)	3 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,262** <sup>(a)</sup>
	A	262 (98,9)	111 (42,4)	83 (31,7)	68 (26,0)	
Pancreatite	P	2 (0,8)	0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	0,162** <sup>(a)</sup>
	A	263 (99,2)	114 (43,3)	81 (30,8)	68 (25,9)	
Colecistite	P	1 (0,4)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	0,257** <sup>(a)</sup>
	A	264 (99,6)	114 (43,2)	83 (31,4)	67 (25,4)	
Bioquímica	TGO/TGP elevada	P	175 (66,0)	63 (36,0)	64 (36,6)	0,004** <sup>(b)</sup>
		A	90 (34,0)	51 (56,7)	19 (21,1)	
	Leucocitose	P	155 (58,5)	59 (38,1)	52 (33,5)	0,149**
		A	110 (41,5)	55 (50,0)	31 (28,2)	
	FA/ $\gamma$ GT elevada	P	143 (54,0)	48 (33,6)	56 (39,2)	0,002** <sup>(b)</sup>
		A	122 (46,0)	66 (54,1)	27 (22,1)	
	Colúria/Bilirrubina	P	68 (25,7)	18 (26,5)	28 (41,2)	0,006** <sup>(b)</sup>
		A	197 (74,3)	96 (48,7)	55 (27,9)	
	Anemia	P	59 (22,3)	19 (32,2)	19 (32,2)	0,082**
		A	206 (77,7)	95 (46,1)	64 (31,1)	
	Hipoxemia	P	47 (17,7)	16 (34,0)	19 (40,4)	0,275**
		A	218 (82,3)	98 (45,0)	64 (29,4)	
	Protrombina	P	41 (15,5)	10 (24,4)	13 (31,7)	0,006** <sup>(b)</sup>
		A	224 (84,5)	104 (46,4)	70 (31,2)	
	Outros	P	206 (77,7)	77 (37,4)	74 (35,9)	0,001** <sup>(b)</sup>
		A	59 (22,3)	37 (62,7)	9 (15,3)	

NC – inconclusivo; P – Presença; A – Ausência; \* Existência de diferenças significativas; \*\* Ausência de diferenças significativas; <sup>(a)</sup> ou em alternativa o Teste Exato de Fisher; <sup>(b)</sup> correção de Bonferroni

A análise estatística mostrou que a infeção por *Leptospira interrogans* foi significativamente mais elevada em diversos quadros clínicos para um nível de significância de 0,05. Porém, pela correção de Bonferroni, foi possível considerar um nível de significância de 0,002 em vez de 0,05, sendo por isso aferido que das significâncias estatísticas apresentadas na Tabela 12, apenas a elevação da FA/ $\gamma$ GT e a presença de hemoptises são significativas.

### 3.2. Comparação sociodemográfica e clínico-epidemiológica da amostra populacional *versus* resultados da micro-ELISA

O total de soros (N=280) foram analisados pela técnica micro-ELISA para a verificação da presença/ausência de anticorpos, imunoglobulinas (Igs) das classes M e G anti-*F. hepatica*, com dois antígenos distintos: o antígeno total (AgT) e o antígeno deslipidizado (AgD) de *F. hepatica*.



**Figura II 3.3.** Doentes analisados pela técnica micro-ELISA (antígeno deslipidizado *versus* total), com anticorpos IgM e IgG anti-*Fasciola hepatica*.

Na deteção de IgM anti-*F. hepatica*, o antígeno completo demonstrou ser mais específico do que o deslipidizado, contrariamente ao verificado na deteção de IgG (Figura II 3.3).

Através do critério de determinação de positividade dos soros, que se cingiu à existência de, pelo menos, dois ensaios de micro-ELISA positivos em cada soro, foi possível verificar que, nas 280 amostras de soro, 105 foram negativas (37,5%), 87 positivas (31,1%) e 88 inconclusivas (31,4%) (Tabela 13).

Na comparação dos resultados da técnica micro-ELISA com os registados pela TAM (primeira amostra) em 83 soros (29,6%) positivos para Leptospirose, 36 (12,9%) também apresentaram positividade pela técnica micro-ELISA. Do total de amostras (N=280), 73 (26,1%) mostraram reatividade inconclusiva para a Leptospirose, das quais 18 soros (6,4%) foram simultaneamente inconclusivas pela técnica de rastreio para a Fasciolose e 21 (7,5%) apresentaram anticorpos anti-*F. hepatica*. Dos 124 soros negativos (44,3%) para a Leptospirose, 53 (18,9%) não apresentaram anticorpos anti-*F. hepatica*, enquanto 30 (10,7%) foram positivas pelo teste micro-ELISA (Tabela 13). Nestas infeções verificou-se não existirem diferenças significativas (McNemar-Bowker;  $P=0,177$ ) entre ambas (Tabela 13).

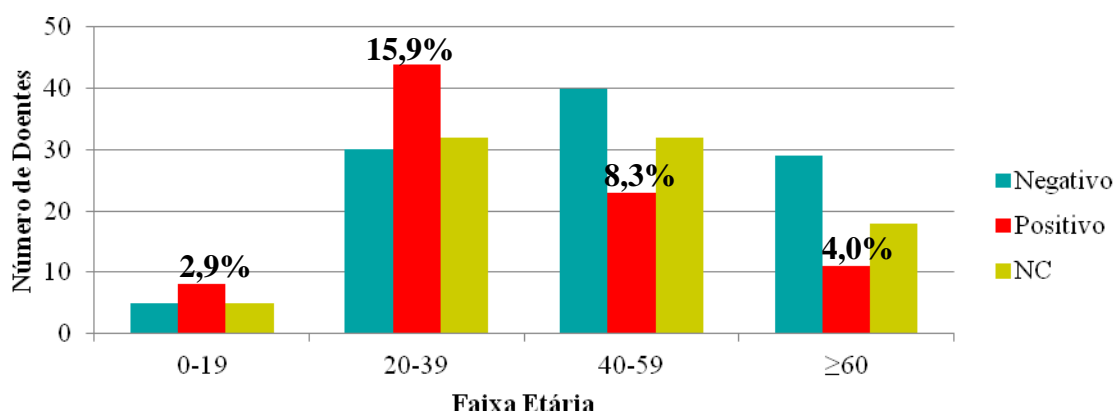
**Tabela 13.** Comparação entre a avaliação da primeira amostra pela TAM (Leptospirose) *versus* teste de rastreio (micro-ELISA) para Fasciolose.

Técnica		TAM			Total n (%)
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
micro-ELISA	Negativo	53 (18,9)	18 (6,4)	34 (12,1)	105 (37,5)
	Positivo	30 (10,7)	36 (12,9)	21 (7,5)	87 (31,1)
	NC	41 (14,6)	29 (10,4)	18 (6,4)	88 (31,4)
Total		124 (44,3)	83 (29,6)	73 (26,1)	280 (100,0)

NC – inconclusivo

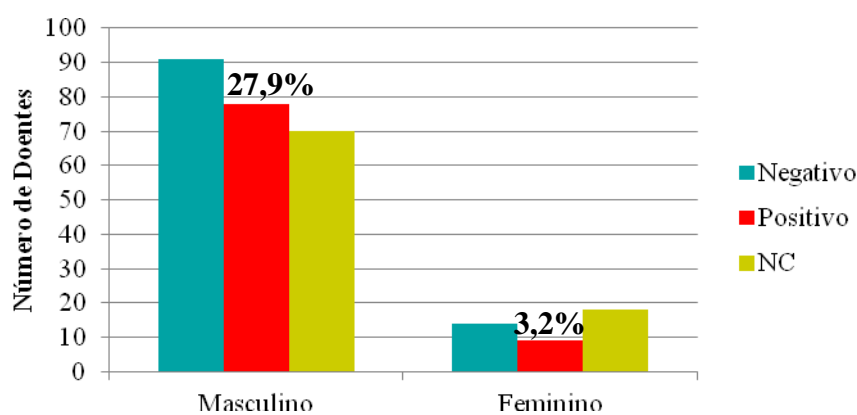
Relativamente aos grupos etários, com base no número de inquéritos em que constava a idade dos doentes (n=277), a distribuição destes de acordo com a presença de anticorpos

anti-*F. hepatica* foi mais prevalente e significativamente mais elevada ( $\chi^2$ ;  $P=0,020$ ) no grupo etário dos 20 aos 39 anos ( $44^+$ ; 15,9%) (Figura II 3.4).



**Figura II 3.4.** Distribuição dos doentes por grupo etário *versus* resultados obtidos pela técnica micro-ELISA.

Quanto à variável “género”, a maior presença de anticorpos anti-*F. hepatica*, verificou-se no género masculino, com 78 indivíduos seropositivos (27,9%) do total de doentes/soros estudados, apesar da inexistência de diferenças significativas ( $\chi^2$ ;  $P=0,149$ ) (Figura II 3.5).



**Figura II 3.5.** Representação gráfica da serorreatividade pela técnica micro-ELISA de acordo com o género.

Comparativamente à profissão/ocupação registada nos inquéritos disponíveis para esta variável ( $n=200$ ), o maior número de casos positivos pela técnica micro-ELISA foi registado nos lavradores, com 20 casos (10,0%) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Distribuição dos doentes avaliados pela técnica micro-ELISA de acordo com a profissão/ocupação.

Profissões / Ocupações	N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Fasciolose		
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)
Lavrador	45 (22,5)	13 (6,5)	20 (10,0)	12 (6,0)
Reformado	24 (12,0)	9 (4,5)	4 (2,0)	11 (5,5)
Pedreiro	22 (11,0)	8 (4,0)	10 (5,0)	4 (2,0)
Domésticas	15 (7,5)	8 (4,0)	1 (0,5)	6 (3,0)
Agricultor	13 (6,5)	6 (3,0)	4 (2,0)	3 (1,5)
Outros	81 (40,5)	29 (14,5)	23 (11,5)	29 (14,5)
N <sub>Total</sub>	200 (100,0)	73 (36,5)	62 (31,0)	65 (32,5)

NC – inconclusivo

Do total de inquéritos existentes para as variáveis epidemiológicas (n=258), foi também possível perceber que, destes, 50 (33,5%) e 34 (30,4%) doentes que mostraram anticorpos anti-*F. hepatica* tiveram contacto com roedores e canídeos, respetivamente (Tabela 15).

**Tabela 15.** Distribuição dos doentes de acordo com as fontes de transmissão mais frequentes para Fasciolose.

Fontes de transmissão		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Fasciolose			P <sub>(χ²)</sub>
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Roedores	P	149 (57,8)	55 (36,9)	50 (33,6)	44 (29,5)	0,690**
	A	109 (42,2)	40 (36,7)	32 (29,4)	37 (33,9)	
Canídeos	P	112 (43,4)	38 (33,9)	34 (30,4)	40 (35,7)	0,416**
	A	146 (56,6)	57 (39,0)	48 (32,9)	41 (28,1)	
Bovinos	P	83 (32,2)	27 (32,5)	33 (39,8)	23 (27,7)	0,166**
	A	175 (67,8)	68 (38,9)	49 (28,0)	58 (33,1)	
Água	P	66 (25,6)	19 (28,8)	23 (34,8)	24 (36,4)	0,284**
	A	192 (74,4)	76 (39,6)	59 (30,7)	57 (29,7)	
Suínos	P	32 (12,4)	13 (40,6)	12 (37,5)	7 (21,9)	0,455**
	A	226 (87,6)	82 (36,3)	70 (31,0)	74 (32,7)	
Outros animais	P	66 (25,6)	24 (36,4)	22 (33,3)	20 (30,3)	0,948**
	A	192 (74,4)	71 (37,0)	60 (31,2)	61 (31,8)	

NC – inconclusivo; P – Presença; A – Ausência; \*\* Ausência de diferenças significativas

Nos inquéritos epidemiológicos (n=265) verificou-se que o quadro clínico mais associado à seropositividade obtida na técnica micro-ELISA foi, por ordem decrescente: febre (77<sup>+</sup>; 32,9%), mialgias (64<sup>+</sup>; 31,8%), cefaleias (52<sup>+</sup>; 32,1%), síndrome gripal (51<sup>+</sup>; 40,8%). Do ponto de vista bioquímico e hematológico, verificou-se em 51 doentes a elevação da TGO/TGP e leucocitose em 45. Estas manifestações clínicas foram as mais evidentes (Tabela 16), verificando-se ainda a existência de diferenças significativas ( $P < 0,05$ ), quando comparadas entre elas. Porém, após a aplicação da correção de Bonferroni, em que o nível de significância é de 0,002, as mesmas deixaram de ter significado estatístico.

**Tabela 16.** Manifestações/quadro clínico *versus* resultados da técnica micro-ELISA.

Manifestações/Quadro clínico		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Fasciolose			$P_{(Y^2)}^{(a)(b)}$
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Febre	P	234 (88,3)	87 (37,2)	77 (32,9)	70 (29,9)	0,236**
	A	31 (11,7)	12 (38,7)	6 (19,4)	13 (41,9)	
Mialgias	P	201 (75,8)	74 (36,8)	64 (31,8)	63 (31,3)	0,934**
	A	64 (24,2)	25 (39,1)	19 (29,7)	20 (31,2)	
Cefaleias	P	162 (61,1)	58 (35,8)	52 (32,1)	52 (32,1)	0,806**
	A	103 (38,9)	41 (39,8)	31 (30,1)	31 (30,1)	
Quadro gripal	P	125 (47,2)	40 (32,0)	51 (40,8)	34 (27,2)	0,007**(b)
	A	140 (52,8)	59 (42,1)	32 (22,9)	49 (35,9)	
Náuseas	P	75 (28,3)	31 (41,3)	24 (32,0)	20 (26,7)	0,554**
	A	190 (71,7)	68 (35,8)	59 (31,1)	63 (33,2)	
Tosse	P	70 (26,4)	25 (35,7)	19 (27,1)	26 (37,1)	0,443**
	A	195 (73,6)	74 (37,9)	64 (32,8)	57 (29,2)	
Vómitos	P	60 (22,6)	26 (43,3)	19 (31,7)	15 (25,0)	0,420**
	A	205 (77,4)	73 (35,6)	64 (31,2)	68 (33,2)	
Icterícia	P	48 (18,1)	15 (31,2)	14 (29,2)	19 (39,6)	0,377**
	A	217 (81,9)	84 (38,7)	69 (31,8)	64 (29,5)	
Odinofagia	P	43 (16,2)	15 (34,9)	13 (30,2)	15 (34,9)	0,856**
	A	222 (83,8)	84 (37,8)	70 (31,5)	68 (30,6)	
Conjuntivite	P	41 (15,5)	13 (31,7)	16 (39,0)	12 (29,3)	0,497**
	A	224 (84,5)	86 (38,4)	67 (29,9)	71 (31,7)	

(Continuação Tabela 16)

Manifestações/Quadro clínico		N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Fasciolose			$P_{(\chi^2)}^{(a)(b)}$
			Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Dispneia	P	30 (11,3)	11 (36,7)	4 (13,3)	15 (50,0)	0,026 <sup>** (b)</sup>
	A	235 (88,7)	88 (37,4)	79 (33,6)	68 (28,9)	
Diarreia	P	16 (6,0)	6 (37,5)	3 (18,8)	7 (43,8)	0,428 <sup>**</sup>
	A	249 (94,0)	93 (37,3)	80 (32,1)	76 (30,5)	
Hemoptises	P	11 (4,2)	4 (36,4)	2 (18,2)	5 (45,5)	0,550 <sup>** (a)</sup>
	A	254 (95,8)	95 (37,4)	81 (31,9)	78 (30,7)	
Petéquias	P	9 (3,4)	6 (66,7)	3 (33,3)	0 (0,0)	0,057 <sup>** (a)</sup>
	A	256 (96,6)	93 (36,3)	80 (31,2)	83 (32,4)	
Hemorragia das mucosas	P	8 (3,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	0,819 <sup>** (a)</sup>
	A	257 (97,0)	95 (37,0)	81 (31,5)	81 (31,5)	
Meningismo	P	3 (1,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	0,060 <sup>** (a)</sup>
	A	262 (98,9)	99 (37,8)	83 (31,7)	80 (30,5)	
Pancreatite	P	2 (0,8)	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,333 <sup>** (a)</sup>
	A	263 (99,2)	97 (36,9)	83 (31,6)	83 (31,6)	
Colecistite	P	1 (0,4)	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1,000 <sup>** (a)</sup>
	A	264 (99,6)	98 (37,1)	83 (31,4)	83 (31,4)	
Bioquímica	TGP/TGO elevadas	P	175 (66,0)	66 (37,7)	51 (29,1)	0,511 <sup>**</sup>
		A	90 (34,0)	33 (36,7)	32 (35,6)	
	Leucocitose	P	155 (58,5)	61 (39,4)	45 (29,0)	0,597 <sup>**</sup>
		A	110 (41,5)	38 (34,5)	38 (34,5)	
	FA/γGT elevadas	P	143 (54,0)	55 (38,5)	39 (27,3)	0,274 <sup>**</sup>
		A	122 (46,0)	44 (36,1)	44 (36,1)	
	Colúria/Bilirrubina	P	68 (25,7)	24 (35,3)	21 (30,9)	0,864 <sup>**</sup>
		A	197 (74,3)	75 (38,1)	62 (31,5)	
	Anemia	P	59 (22,3)	17 (28,8)	20 (33,9)	0,285 <sup>**</sup>
		A	206 (77,7)	82 (39,8)	63 (30,6)	
	Hipoxemia	P	47 (17,7)	15 (31,9)	11 (23,4)	0,088 <sup>**</sup>
		A	218 (82,3)	84 (38,5)	72 (33,0)	
	Protrombina	P	41 (15,5)	12 (29,3)	9 (22,0)	0,031 <sup>** (b)</sup>
		A	224 (84,5)	87 (38,8)	74 (33,0)	

(Continuação Tabela 16)

Manifestações/Quadro clínico			N.º de doentes (%)	Serorreatividade para a Fasciolose			$P_{(\chi^2)}^{(a)(b)}$
				Negativo n (%)	Positivo n (%)	NC n (%)	
Bioq.	Outros	P	206 (77,7)	77 (37,4)	60 (29,1)	69 (33,5)	0,244**
		A	59 (22,3)	22 (37,3)	23 (39,0)	14 (23,7)	

NC – inconclusivo; P – Presença; A – Ausência; \* Existência de diferenças significativas; \*\* Ausência de diferenças significativas; <sup>(a)</sup> ou em alternativa o Teste Exato de Fisher; <sup>(b)</sup> correção de Bonferroni

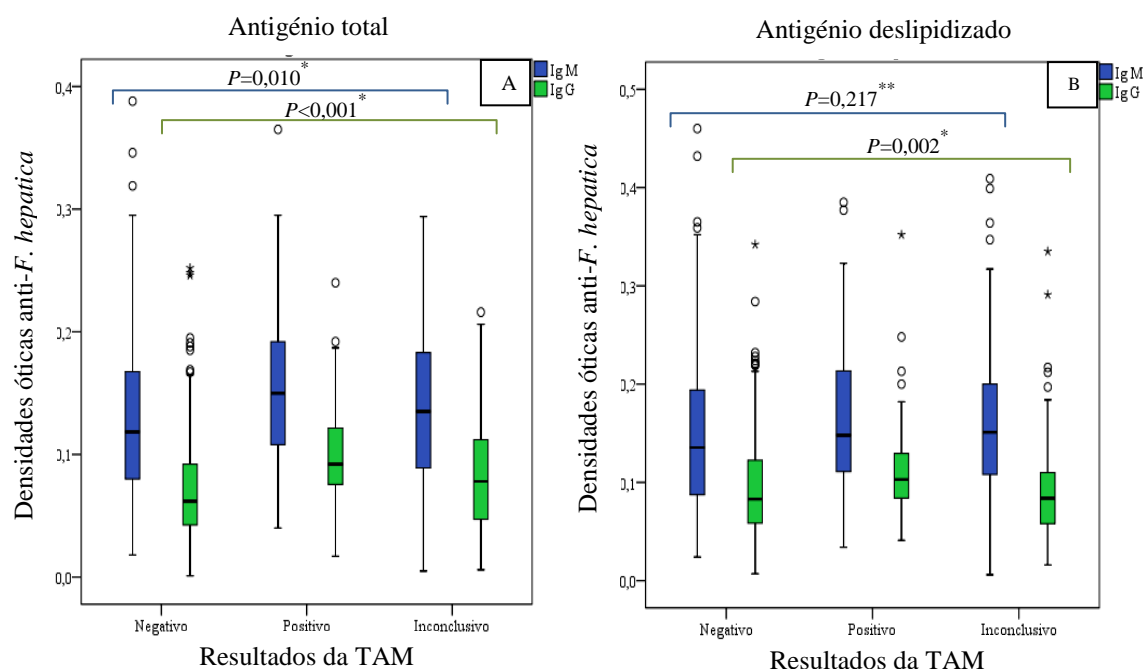
### 3.3. Tratamento estatístico dos resultados obtidos pela técnica micro-ELISA

Observaram-se também os níveis séricos de IgM e IgG para o antígeno, total (*AgT*) e deslipidizado (*AgD*), cujas densidades óticas obtidas pela técnica micro-ELISA permitiram inferir os resultados da TAM (positivo, inconclusivo e negativo) [Tabela 17]. A Figura II 3.6 demonstra a possível tendência para a seroconversão (negativa ou positiva) dos soros com resultado inicial inconclusivo pela TAM. Verificou-se a existência de diferenças significativas, pelo teste Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ), nos níveis séricos da IgM anti-*F. hepatica* exclusivamente quando testado com o *AgT* (Figura II 3.6 A). Porém, pelas comparações múltiplas do anticorpo IgM anti-*F. hepatica* no *AgT*, foi entre os resultados negativo-positivo (TAM) que se observaram as diferenças significativas (Figura II 3.7 A). Os indivíduos com Leptospirose apresentaram níveis séricos de IgG anti-*F. hepatica*, tanto no *AgT* (Figura II 3.6 A) como no *AgD* (Figura II 3.6 B) significativamente mais elevados, pelo teste Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ), do que os não infetados por *L. interrogans*, como também verificado nas respetivas comparações múltiplas (Figura II 3.7 B e C).



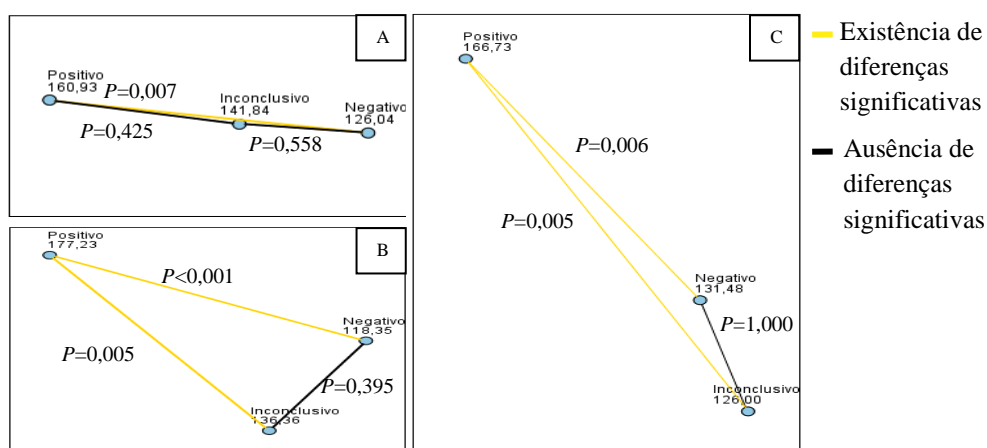
**Tabela 17.** Níveis séricos dos anticorpos anti-*Fasciola hepatica* (IgM e IgG) observados nos soros previamente avaliados pela TAM.

			Densidades óticas anti- <i>F. hepatica</i>			
			IgM		IgG	
			AgD	AgT	AgD	AgT
Resultados da TAM	Negativo	Média	0,150	0,132	0,098	0,075
		Mediana	0,136	0,119	0,083	0,062
		Desvio-padrão	0,085	0,069	0,059	0,048
		Mínimo	0,024	0,018	0,007	0,001
		Máximo	0,460	0,388	0,342	0,252
	Positivo	Média	0,162	0,156	0,112	0,100
		Mediana	0,148	0,150	0,103	0,092
		Desvio-padrão	0,073	0,061	0,047	0,039
		Mínimo	0,034	0,040	0,041	0,017
		Máximo	0,385	0,365	0,352	0,240
	NC	Média	0,163	0,142	0,094	0,083
		Mediana	0,151	0,135	0,084	0,078
		Desvio-padrão	0,084	0,067	0,057	0,049
		Mínimo	0,006	0,005	0,016	0,006
		Máximo	0,409	0,294	0,335	0,216



**Figura II 3.6.** Diagrama de extremos e quartis das densidades óticas dos anticorpos anti-*Fasciola hepatica* versus resultados da TAM no antigénio total (AgT) e no deslipidizado (AgD), com presença dos candidatos a valores desviantes (*outliers*) moderados (o) e severos (\*). **A-** Resultado obtido com AgT para IgM e IgG anti-*Fasciola hepatica*; **B-** Resultado obtido com AgD para IgM e IgG anti-*Fasciola hepatica*.

\*Existência de diferenças significativas; \*\* Ausência de diferenças significativas



**Figura II 3.7.** Representação gráfica da comparação múltipla dos resultados obtidos pela TAM através dos valores de densidades óticas obtidas (micro-ELISA). **A-** Anticorpo IgM anti-*Fasciola hepatica* para o AgT; **B-** Anticorpo IgG anti-*Fasciola hepatica* para o AgT; **C-** Anticorpo IgG anti-*Fasciola hepatica* para o AgD.

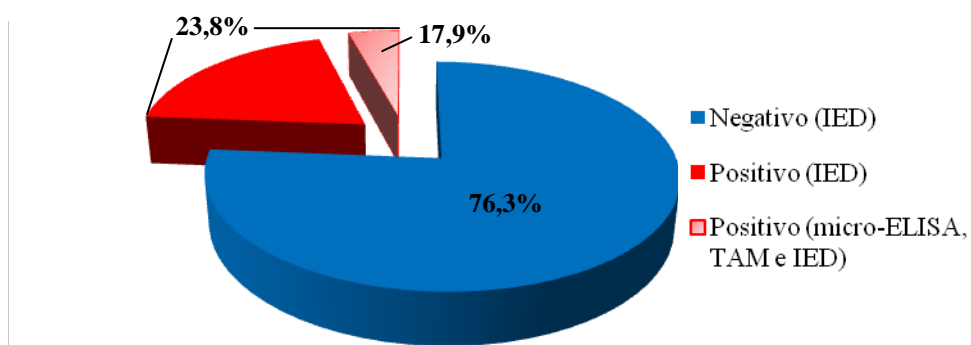
### 3.4. Avaliação dos soros pelo método imunológico Imunoeletrodifusão – IED

Utilizou-se também a técnica IED (Figura II 3.8) com os dois antígenos (AgD e AgT), num total de 118 soros, correspondentes aos soros que foram positivos pela técnica micro-ELISA, independentemente dos resultados obtidos na TAM, e ainda se incluíram algumas amostras que foram inconclusivas por micro-ELISA.



**Figura II 3.8.** Resultados obtidos na IED. **A-** Resultado positivo; **B-** Resultado negativo. (Fotografia do autor)

Foi possível observar, nesta técnica, a existência de 28 soros positivos (23,8%) e 90 negativos (76,3%) (Figura II 3.9). É de salientar que dos 28 soros com resultados positivos pela IED, somente cinco ( $5^+$ ; 17,9%) foram também positivos nas outras duas técnicas (Figura II 3.9).



**Figura II 3.9.** Representação gráfica dos resultados obtidos na IED.

## **4. DISCUSSÃO**

Neste trabalho estudaram-se duas patologias (Leptospirose e Fasciolose) com alguma semelhança nos sinais e sintomas que originam, no entanto, estas patologias derivam de dois agentes etiológicos diferentes, uma bactéria (*Leptospira interrogans* sensu lato) e um parasita (*Fasciola hepatica*), respetivamente.

A amostra-alvo deste estudo incidiu sobretudo nos soros com resultado positivo e inconclusivo pela TAM para a Leptospirose, devido ao diagnóstico diferencial que se pretendia realizar. Porém, na seleção da amostra-alvo verificou-se a existência de uma considerável percentagem de soros com resultado inconclusivo. Para este tipo de resultados, a OMS preconizou a obtenção de, pelo menos, duas amostras com aproximadamente 15 dias de intervalo entre si para cada doente, para se poder concluir se se está perante um “caso positivo” de Leptospirose (face a uma primeira amostra negativa ou inconclusiva)<sup>(56,112)</sup>.

No presente trabalho, a Leptospirose manifestou-se maioritariamente em homens lavradores na idade ativa. Tal facto deve-se ao contacto com ambientes hídricos contaminados por urina de roedores com leptospiros, contribuindo também para a disseminação das bactérias para outros ambientes agrícolas, como por exemplo através de sistemas de rega. Estas constatações são concordantes com o perfil de risco delineado pelas “Linhas de Orientação” para a vigilância epidemiológica da Leptospirose em curso nos Açores<sup>(23)</sup>, bem como noutras regiões do mundo<sup>(33,49,69,108,117)</sup>.

Os resultados deste estudo são análogos à literatura estudada, que sugerem uma alteração das tendências epidemiológicas desta doença, que inicialmente acometia mais a população jovem mas atualmente parece afetar a população mais envelhecida<sup>(108)</sup>.

Neste estudo, os resultados demonstram que a transmissão das leptospiros à população se deve principalmente aos roedores (reservatórios silvestres), o que corrobora os resultados de outros autores<sup>(23,25,108)</sup>. A ação preponderante dos bovinos, no contexto agropecuário e alimentar na ilha de São Miguel<sup>(115)</sup>, e a dos canídeos, pelo seu contacto com humanos, animais (reservatórios/hospedeiros) e ambientes propícios à disseminação das leptospiros<sup>(23)</sup>, apontam para que estes sejam potenciais “atores” na transmissão das leptospiros. Por este motivo, surge a necessidade de vigilância e vacinação, em particular, nas referidas espécies.

No que respeita ao “quadro clínico (sinais e sintomas)” da Leptospirose, este é geralmente diversificado e inespecífico<sup>(30,69)</sup>. Os sintomas mais verificados nos doentes com resultados positivos para a referida doença são coincidentes com os descritos na bibliografia consultada, sendo indicadores da fase anictérica<sup>(9,27,28,29,30,49,56)</sup>, porém estas manifestações são também totalmente sobreponíveis com um quadro gripal, por exemplo. Por sua vez, do ponto de vista analítico, os parâmetros mais evidentes neste estudo, nos doentes cujo resultado foi positivo para Leptospirose, são geralmente produzidos acentuadamente na fase ictérica da patologia<sup>(3,9,21,32,56)</sup>, permitindo assim inferir que estes corresponderiam a uma infeção mais avançada.

A limitada amostragem do estudo e o elevado número de sinais e sintomas analisados foram motivo de preocupação, tendo levado à realização de testes estatísticos para as referidas manifestações clínicas de modo a reduzir a possibilidade de diferenças significativas erróneas. Para o conjunto enzimático (FA/ $\gamma$ GT), a significância estatística observada sugere que estes enzimas têm importância no quadro de Leptospirose ictérica.

A Fasciolose também é endémica em São Miguel, porém, atualmente, é negligenciada. Neste estudo, as amostras de soro dos doentes anteriormente referidos, no contexto da Leptospirose, foram igualmente estudadas pela técnica de rastreio (micro-ELISA) para o imunodiagnóstico humano da Fasciolose através do protocolo estabelecido no laboratório de Helminologia e Malacologia Médicas (GH&MM). Esta técnica necessita da utilização de antígenos específicos para aumentar a especificidade e a sensibilidade na deteção de anticorpos anti-*Fasciola*, podendo, no entanto, existirem reações cruzadas e/ou falsos positivos com outros parasitas devido a possíveis características comuns<sup>(17,60,78)</sup>.

Para a confirmação dos resultados obtidos na técnica micro-ELISA foram utilizados soros-controlo (positivos e negativos) que tinham sido analisados previamente.

Na análise dos resultados deste estudo e após a realização do *cut-off* da técnica micro-ELISA, considerados três desvios-padrão devido ao endemismo da patologia na ilha de São Miguel, foi atribuído um critério de determinação de positividade aos soros para permitir uma análise mais abrangente da capacidade diagnóstica da referida técnica.

Com a utilização de dois antígenos distintos de *F. hepatica*, total (AgT) e deslipidizado (AgD), observaram-se resultados díspares quando comparados entre si para a imunoglobulina M (IgM) e G (IgG). Esses resultados sugerem que o AgT é mais específico para a IgM. Quanto ao AgD, os dados apontam para uma maior especificidade na IgG.

O antígeno total é geralmente utilizado no imunodiagnóstico humano. Porém, comparativamente com outros antígenos também empregues no diagnóstico humano, como o de excreção-secreção, o AgT é menos específico devido às inúmeras proteínas presentes, demonstrando uma grande heterogeneidade, como se verifica em estudos realizados em animais <sup>(17,20,78,91)</sup>.

Para o antígeno deslipidizado de *F. hepatica* observou-se a quase inexistência de estudos realizados com o mesmo. Todavia, encontrou-se um estudo efetuado por Almeida A. (2011) <sup>(6)</sup> com as mesmas imunoglobulinas e antígenos de *F. hepatica*, e ainda de *F. gigantica*, onde foi possível verificar uma concordância com os dados por nós observados. Contudo, existe a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre o antígeno deslipidizado para uma futura aplicação no imunodiagnóstico humano.

Neste estudo a utilização das imunoglobulinas M e G, surgiram como uma tentativa de análise mais ampla na deteção das diversas fases da Fasciolose nas amostras utilizadas.

A comparação dos dados obtidos na técnica TAM e micro-ELISA permitiu observar a existência de algumas possíveis coinfeções ou reações cruzadas. Porém, ambas as técnicas referidas têm “papéis” distintos para as respetivas patologias, pois a TAM é uma técnica de referência e a técnica micro-ELISA é de rastreio, com a necessidade de uma técnica de confirmação.

O endemismo de *F. hepatica* e *Leptospira* spp na ilha de São Miguel e a inexistência de literatura relacionada com reações cruzadas entre estes agentes sugerem que neste estudo possam existir coinfeções. Da revisão da literatura, sabe-se que quando existe coinfeção de um hospedeiro com *F. hepatica* e bactérias, em particular em modelos animais, ocorre uma desregulação do sistema imunitário do hospedeiro devido ao parasita, que impede a resposta imunológica perante a infeção bacteriana através da diminuição do respetivo reconhecimento e da produção de proteínas específicas, podendo até ocorrer uma segunda coinfeção bacteriana <sup>(41,48,97)</sup>. Porém, posteriormente à

infecção pelo parasita, a infecção bacteriana é agravada, podendo causar a morte dos indivíduos infetados, o que é mais frequente em crianças <sup>(97)</sup>.

Com base na análise dos inquéritos epidemiológicos e dos resultados da técnica micro-ELISA, foi possível observar uma tendência de um “provável” padrão epidemiológico de Fasciolose na ilha de São Miguel.

Sabe-se que nas regiões endémicas para Fasciolose são geralmente as crianças as mais afetadas por esta parasitose, como acontece no Altiplano da Bolívia, mas também existem registos em que os adultos (a partir dos 20 anos) têm uma elevada prevalência de Fasciolose, o que é concordante com o nosso estudo <sup>(65,66,67,114)</sup>.

Relativamente ao género, são geralmente as mulheres as mais afetadas pela Fasciolose nas regiões endémicas devido à proximidade das suas atividades diárias com as fontes de transmissão, como se verifica, por exemplo, no Egito <sup>(66,67,113,114)</sup>. Esta informação, porém, é discordante com os resultados obtidos, já que são os homens que têm um maior contacto com as fontes de transmissão de *F. hepatica* em S. Miguel.

No que respeita à atividade profissional, não foi possível verificar na literatura, a associação entre a profissão e/ou ocupação e a prevalência de infecção pelo referido parasita.

Os roedores são considerados os mais recentes hospedeiros definitivos de *F. hepatica*, conforme constatado na Córsega <sup>(113)</sup>, o que é concordante com os resultados observados neste estudo. Relativamente aos canídeos, a pesquisa bibliográfica realizada permitiu verificar que estes animais não são considerados normalmente hospedeiros de *F. hepatica*, todavia, constata-se que indivíduos detentores de cães podem ser alvo do parasita dada a proximidade e o fácil contacto entre estes animais e os hospedeiros domésticos do mesmo <sup>(63)</sup>, o que pode indicar que seja esta a situação existente na ilha de São Miguel.

As manifestações/quadros clínicos da Fasciolose são também diversificados e inespecíficos <sup>(38,92,93,102)</sup>, como na Leptospirose. Neste estudo as manifestações clínicas mais comuns nos doentes com resultados positivos para Fasciolose, foram concordantes com as que se verificam normalmente numa fase inicial/aguda da infecção <sup>(38,54,92,102)</sup>, podendo indicar que os doentes estudados se encontravam no início da infecção ou que apresentavam anticorpos anti-*Fasciola* de uma infecção passada.



É ainda de referir que a utilização da uma única amostra de soro dos doentes estudados neste trabalho foi uma limitação. Assim, para a avaliação imunológica proposta, são indispensáveis as segundas amostras de soro dos doentes para o acompanhamento da cinética de anticorpos específicos e a consequente verificação de uma seroconversão dos soros inicialmente com resultados inconclusivos pela TAM, sendo que os nossos resultados, com as amostras disponíveis, apontam para um provável resultado negativo.

Após a análise dos soros com a técnica micro-ELISA, verificou-se a necessidade de aplicar uma técnica de confirmação, idealmente o *immunoblot* (SDS-PAGE/Western Blot) <sup>(92,94)</sup>. Porém, devido a problemas técnicos e de cronograma, não foi possível recorrer a estas técnicas, tendo-se adotado um teste alternativo que, geralmente, no laboratório GH&MM, é considerado como técnica de rastreio, a Imunoeletrodifusão (IED), também denominada de Eletroimunodifusão ou Eletrossinérese <sup>(103)</sup>. O objetivo deste teste é semelhante ao da técnica de Imunodifusão (ID) radial, contudo utiliza-se corrente elétrica para uma maior rapidez na obtenção do resultado <sup>(14,103)</sup>. Estas técnicas são geralmente pouco sensíveis, mas dependendo da reatividade da patologia em análise, podem ser fiáveis, como acontece com a Fasciolose <sup>(103)</sup>. Porém, é sempre necessária a utilização de soros-controlo para a confirmação dos resultados obtidos, como realizado neste estudo.

Após a análise das amostras pela técnica IED, é ainda necessária a realização de uma técnica de referência, apesar da existência de amostras de soros com resultado positivo nas duas técnicas de rastreio, o que pode indicar uma quase certeza de coinfeção. Na bibliografia pesquisada não existe, até agora, nenhum estudo sobre a coinfeção entre os dois agentes patogénicos, o que deixa uma questão pertinente sobre as interações entre ambos.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Do presente estudo e dos dados obtidos no âmbito desta investigação, foi possível: *i)* considerar que os fatores sociodemográficos e clínico-epidemiológicos verificados nos doentes, com Leptospirose e Fasciolose, são bastante similares entre si, o que leva a uma difícil dissociação destes fatores na comparação entre as duas patologias na ilha de São Miguel; *ii)* observar e comparar as diversas manifestações clínicas de ambas as patologias, sendo muito similares na fase inicial das duas doenças; *iii)* aferir a possibilidade da presença de coinfeções, apesar da necessidade de uma técnica de confirmação para resultados mais sustentável, apesar da tentativa de substituição pela técnica IED; *iv)* verificar qual o possível resultado de uma seroconversão das amostras de soro inicialmente inconclusivas pela TAM; *v)* alertar para a necessidade da realização de um estudo relativo à prevalência da Fasciolose humana na ilha de São Miguel, Açores, seguida da implementação de vigilância epidemiológica para *Fasciola hepatica* e a Fasciolose, de modo a sensibilizar os Clínicos para esta patologia aquando da respetiva suspeita.

Na possibilidade de alterar certos aspetos deste estudo, o enfoque residiria na utilização da técnica *immunoblot* para confirmação dos resultados obtidos pela técnica micro-ELISA. Aplicar-se-iam ainda neste estudo as segundas amostras de soro dos doentes com resultado prévio inconclusivo pela TAM para se observar a possível seroconversão das mesmas.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

1. **Açores, G.** 2004. *Governo dos Açores: São Miguel* [Online]  
Disponível em: [http://www.azores.gov.pt/Portal/pt/entidades/sre-drt/textoImagem/Inf\\_uteis+smg.htm?lang=pt&area=ct](http://www.azores.gov.pt/Portal/pt/entidades/sre-drt/textoImagem/Inf_uteis+smg.htm?lang=pt&area=ct)  
[Acedido em 19 Maio 2012]
2. **Adler, B. & de la Peña Moctezuma, A.** 2010. Leptospira and leptospirosis. *Vet Microbiol*, **140**:287-296.
3. **Ahmad, S. N., Shah, S. & Ahmad, F.** 2005. Laboratory Diagnosis of Leptospirosis. *J Postgrad Med*, **51**:195-200.
4. **Ai, L., Dong, J., Zhang, W. Y., Elsheikha, H. M., Mahmmoud, Y. S., Lin, R. Q., Yuan, Z. G., Shi, Y. L., Huang, W. Y., Zhu, X. Q.** 2010. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: their development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys. *Ann Trop Med Parasitol*, **104**:65-72.
5. **Aksoy, D. Y., Kerimoglu, U., Oto, A., Erguvem, S., Arslan, S., Unal, S., Batman, F., Bayraktar, Y.** 2005. Infection with *Fasciola hepatica*. *Clin Microbiol Infect*, **11**:859-861.
6. **Almeida, A. P.** 2011. Produção e Caracterização de Antígenos de *Fasciola gigantica* e sua Avaliação no Imunodiagnóstico de Fasciolose. *Dissertação de Mestrado em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa, 144 pp.
7. **Arosa, F. A., Cardoso, E. M. & Pacheco, F. C.** 2007. *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel – Edições Técnicas, Lda., 339 pp.
8. **Bernal, D., de la Rubia, J. E., Carrasco-Abad, A. M., Toledo, R., Mas-Coma, S., Marcilla, A.** 2004. Identification of enolase as a plasminogen-binding protein in excretory/secretory products of *Fasciola hepatica*. *FEBS Lett*, **563**:203-206.
9. **Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E., Vinetz, J. M.** 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*, **3**:757-771.

10. **Bolin, C. A.** 2008. Leptospirosis. In: OIE Biological Standards Commission, ed. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. França: OIE, 2:251-264. Disponível em: <http://www.oie.int/doc/ged/D7710.PDF>
11. **Brandão, A. P., Camargo, E. D., Silva, E. D., Silva, M. V., Abrão, R. V.** 1998. Macroscopic Agglutination Test for Rapid Diagnosis of Human Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, **36**:3138-3142.
12. **Branger, C., Blanchard, B., Fillonneau, C., Suard, I., Aviat, F., Chevallier, B., André-Fontaine, G.** 2005. Polymerase chain reaction assay specific for pathogenic *Leptospira* based on the gene hap1 encoding the hemolysis-associated protein-1. *FEMS Microbiol Lett*, **243**:437-445.
13. **Brown, P. D., Gravekamp, C., Carrington, D. G., Van de Kemps, H., Hartskeerls, R. A., Edwards, C. N., Everard, C. O., Terpstra, W. J., Levett, P. N.** 1995. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. *J Med Microbiol*, **43**:110-114.
14. **Burmester, G. R. & Pezzutto, A.** 2005. *Imunologia, Texto e Atlas*. Alemanha: Lidel – Edições Técnicas, Lda., 322 pp.
15. **Burriel, A. R.** 2010. Leptospirosis: an important zoonotic disease. In: Méndez-Vilas, A. ed. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Espanha: Formatex, 2:687-693. Disponível em: <http://www.formatex.info/microbiology2/687-693.pdf>
16. **Calretas, S., Laiz, M., Simão, A., Carvalho, A., Rodrigues, A., Sá, A., Santos, A., Santos, R., Silva, J. A., Reis, C., Almiro, E., Porto, A.** 2003. Seis casos de Fasciolíase hepática. *Medicina Interna*, **10**:185-192.
17. **Carnevale, S., Rodriguez, M. I., Santillan, G., Labbe, J. H., Cabrera, Marta G., Bellegarde, E. J., Velasquez, J. N., Trogovcic, J. E., Guarnera, E. A.** 2001. Immunodiagnosis of Human Fascioliasis by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and a Micro-ELISA. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**:174-177.
18. **Carreira, T. M.** 2009. Implementação de métodos moleculares para o diagnóstico precoce da leptospirose humana. *Dissertação de Mestrado de Biotecnologia, Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa, 65 pp.

19. **Cerqueira, G. M. & Picardeau, M.** 2009. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect Genet Evol*, **9**:760-768.
20. **Cervi, L. A., Rubinstein, H. & Masih, D. T.** 1992. Serological, Electrophoretic and Biological properties of *Fasciola hepatica* antigens. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, **34**:517-525.
21. **Chang, M. L., Yang, C.W., Chen, J. C, Ho, Y. P., Pan, M. J., Lin, C. H., Lin, D. Y.** 2005. Disproportional exaggerated aspartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. *World J Gastroenterol*, **11**:5553-5556.
22. **Coelho, M. S. & Massad, E.** 2012. The impact of climate on Leptospirosis in São Paulo, Brazil. *Int J Biometeorol*, **56**:233-241.
23. **Collares-Perreira, M., Flor, L. & ECLRAA, E. d. P.** 2009. Epidemiologia e Controlo da Leptospirose na Região Autónoma dos Açores (2004-2008): Síntese do Projeto e Linhas de Orientação. *Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa/Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa/Secretaria Regional da Saúde e Secretaria Regional da Agricultura e Florestas da Região Autónoma dos Açores*, 15 pp.
24. **Collares-Pereira, M., Korver, H., Cao Thi, B.V., Santos-Reis, M., Bellenger, E., Baranton, G., Terpstra, W. J.** 2000. Analysis of *Leptospira* isolates from mainland Portugal and the Azores islands. *FEMS Microbiol Lett*, **185**:181-187.
25. **Collares-Perreira, M., Mathias, M. L., Santos-Reis, M., Ramalhinho, M. G., Duarte-Rodrigues, P.** 2000. Rodents and *Leptospira* transmission risk in Terceira island (Azores). *Eur J Epidemiol*, **16**:1151-1157.
26. **Costa, A. M.** 2010. Fasciolose Bovina: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos no Alentejo. *Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa*, Lisboa, 91 pp.
27. **Crespo, J.** 1990. Leptospirose: Importância do serogrupo “Pomona” na região do Centro do país: Revisão da casuística do Serviço de Medicina III, Hospital da Universidade de Coimbra. *J Med*, **129**:148-152. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10400.4/1002>

28. **Daher, E., Abreu, K. L. & Silva Junior, G. B.** 2010. Insuficiência renal aguda associada à leptospirose. *J Bras Nefrol*, **32**:408-415.
29. **Dolhnikoff, M., Mauad, T., Bethlem, E. P. & Carvalho, C. R.** 2007. Pathology and Pathophysiology of Pulmonary Manifestations in Leptospirosis. *BJID*, **11**:142-148.
30. **Dutta, T. K. & Christopher, M.** 2005. Leptospirosis – An Overview. *JAPI*, **53**:545-551.
31. **Dzik, J. M.** 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol*, **53**:33-64.
32. **Elkis, H., Neto, V. A. & Meira, J. A.** 1962. Transaminase Glutâmico-Oxalacética no Soro de pacientes com Leptospirose. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, **4**:217-219.
33. **Ellis, T., Imrie, A., Katz, A. R. & Effler, P. V.** 2008. Underrecognition of Leptospirosis during a Dengue Fever Outbreak in Hawaii, 2001-2002. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **8**:541-547.
34. **Eshghi, A., Cullen, P. A., Cowen, L., Zuerner, R. L.; Cameron, C. E.** 2009. Global Proteome Analysis of *Leptospira interrogans*. *J Proteome Res*, **8**:4564-4578.
35. **Espino, A. M., Díaz, A., Pérez, A. & Finlay, C. M.** 1998. Dynamics of Antigenemia and Coproantigens during a Human *Fasciola hepatica* Outbreak. *J Clin Microbiol*, **36**:2723-2726.
36. **Evangelista, K. V. & Coburn, J.** 2010. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*, **5**:1413-1425.
37. **Farghaly, A. M., Nada, S., Emam, W. A., Mattar, M. A., Mohamed, S. M., Sharaf, E. M., El Gamal, R. L.** 2009. Role of Fast-ELISA and Western Blot in Diagnosis of Human Fascioliasis Using Crude Adult Worm and Excretory/Secretory Fasciola Antigens. *PUJ*, **2**:55-65.



38. **Ferreira, F. & Oliveira, C. F.** 1960. A propósito dum Novo Caso de Fasciolíase. *Separata dos Anais do Instituto de Medicina Tropical*, **17**:51-81.
39. **Fica, A., Dabanch, J., Farias, C., Castro, M., Jercic, M. I., Weitzel, T.** 2012. Acute Fascioliasis-Clinical and epidemiological features of four patients in Chile. *Clin Microbiol Infect*, **18**:91-96.
40. **Field, A.** 2005. *Discovering Statistics Using SPSS*. 2.<sup>a</sup> ed. Inglaterra: Sage Publications, 816 pp.
41. **Flynn, R. J., Mannion, C., Golden, O., Hacariz, O., Mulcahy, G.** 2007. Experimental *Fasciola hepatica* infection alters responses to tests used for diagnosis of bovine tuberculosis. *Infect Immun*, **75**:1373-1381.
42. **Fonseca, J. M., Bastos, J. G. & Almeida, V. C.** 1991. *Saúde Animal na Região Autónoma da Madeira. Implicações Económicas e em Saúde Pública*. [Online] Disponível em:  
[http://www.vetbiblios.pt/ARTIGOS\\_TECNICOS/Artigos\\_Tecnicos.htm](http://www.vetbiblios.pt/ARTIGOS_TECNICOS/Artigos_Tecnicos.htm)  
[Acedido em 19 Maio 2012]
43. **Fraga, T. R., Barbosa, A. S. & Isaac, L.** 2011. Leptospirosis: Aspects of Innate Immunity, Immunopathogenesis and Immune Evasion From the Complement System. *Scand J Immunol*, **73**:408-419.
44. **Gonçalves, A. T.** 2009. Leptospirose em São Miguel: caracterização dos primeiros isolados humanos de *Leptospira* sp. e diferenciação molecular de estirpes isoladas dos principais reservatórios silváticos. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica, Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa, 114 pp.
45. **Gonçalves, A. T., Paiva, C., Melo-Mota, F., Vieira, M. L., Carreira, T., Nunes, M. S., Mota-Vieira, L., Ahmed, A., Harstkeerl, R. A., Hyde, K., Collares-Pereira, M.** 2010. First isolation of human *Leptospira* strains, Azores, Portugal. *Int J Infect Dis*, **14S**:e148-e153.
46. **Grove, D. I.** 1990. *A History of Human Helminthology*. Inglaterra: C. A. B Internacional, 851 pp.

47. **Guerrant, R. L., Walker, D. H. & Weller, P. F.** 2011. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens & Practice*. 3.<sup>a</sup> ed., Estados Unidos da América, Elsevier Saunders, 1156 pp.
48. **Hamilton, C. M., Dowling, D. J., Loscher, C. E., Morphey, R. M., Brophy, P. M., O'Neil, S. M.** 2009. The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. *Infect Immun*, **77**:2488-2498.
49. **Hartskeerl, R. A., Collares-Pereira, M. & Ellis, W. A.** 2011. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. *Clin Microbiol Infect*, **17**:494-501.
50. **Hurtrez-Boussès, S., Meunier, C., Durand, P. & Renaud, F.** 2001. Dynamics of host-parasite interactions: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). *Microbes Infect*, **3**:841-849.
51. Information, N. C. B. 1988. *NCBI-Taxonomy Browser*. [Online]  
  
Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6192&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s>  
  
[Acedido em 19 Maio 2012]
52. Information, N. C. B. 1988. *NCBI-Taxonomy Browser*. [Online]  
  
Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=253437&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>  
  
[Acedido em 21 Maio 2012]
53. **Jansen, A., Schöneberg, I., Frank, C., Alpers, K., Schneider, T., Stark, K.** 2005. Leptospirosis in Germany, 1962-2003. *Emerg Infect Dis*, **11**:1048-1054.
54. **Kholy, Z. A., Heshmat, M. G., Shaheen, N. E. & El-Sheety, A. G.** 2008. Bile Acids Assessment in Fascioliasis as a Hepatobiliary Disease. *JMRI*, **29**:47-52.

55. Ko, A. I., Elkhoury, A. N., Spichler, A. S., Seguro, A. C., Filho, D. B., Martins, E. C., Ribeiro, G. S., Brant, J. L., Oliveira, J. C., Avelar, K. E., Buzzar, M., Silva, M. V., Arsky, M. L., Costa, M. R., Pereira, M. M., Galliez, R. M., Couto, R. 2009. Leptospirose. In: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de Vigilância Epidemiológica, edits. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. Brasil: Ministério da Saúde, 502-520. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia\\_vig\\_epid\\_novo2.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_vig_epid_novo2.pdf)
56. Levett, P. N. 2001. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*, **14**:296-326.
57. Levett, P. N., Branch, S. L., Whittington, C. U., Edwards, C. N., Paxton, H. 2001. Two Methods for Rapid Serological Diagnosis of Acute Leptospirosis. *Clin Diagn Lab Immunol*, **8**:349-351.
58. Looney, S. W. 2002. *Biostatistical Methods*. Estados Unidos da América: Humana Press, Inc., 214 pp.
59. Mahami-Oskouei, M., Dalimi, A., Forouzandeh-Moghadam, M. & MB Rokni, M. 2011. Molecular Identification and Differentiation of *Fasciola* Isolates Using PCR-RFLP Method Based on Internal Transcribed Spacer (*ITS1*, 5.8S *rDNA*, *ITS2*). *Iranian J Parasitol*, **6**:35-42.
60. Maher, K., EL Ridi, R., Elhoda, A. N., EL-Ghannam, M., Shaheen, H., Shaker, Z., Hassanein, H. I. 1999. Parasite-Specific antibody profile in Human Fascioliasis: Application for Immunodiagnosis of infection. *Am J Trop Med Hyg*, **61**:738-742.
61. Marcilla, A., De la Rubia, J. E., Sotillo, J., Bernal, D., Carmona, C., Villavicencio, Z., Acosta, D., Tort, J., Bornay, F. J., Esteban, J. G., Toledo, R. 2008. Leucine aminopeptidase is an immunodominant antigen of *Fasciola hepatica* excretory and secretory products in human infections. *Clin Vaccine Immunol*, **15**:95-100.

62. Marcos, L. A., Tagle, M., Terashima, A., Bussalleu, A., Ramirez, C., Carrasco, C., Valdez, L., Huerta-Mercado, J., Freedman, D. O., Vinetz, J. M., Gotuzzo, E. 2008. Natural History, Clinicoradiologic Correlates, and Response to Triclabendazole in Acute Massive Fascioliasis. *Am J Trop Med Hyg*, **78**:222-227.
63. Marcos, L., Maco, V., Samalvides, F., Terashima, A., Espinoza, J. R., Gotuzzo, E. 2006. Risk factors for *Fasciola hepatica* infection in children: a case-control study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **100**:158-166.
64. Martins, A. M. 1993. The Azores-Westernmost Europe: Where Evolution can be caught Red-handed. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 181-198.
65. Mas-Coma, M. S., Esteban, J. & Bargues, M. 1999. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. *Bull World Health Organ*, **77**:340-346.
66. Mas-Coma, S. 2004. Human Fascioliasis: Epidemiological Patterns in Human Endemic Areas of South America, Africa and Asia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **35**:1-11.
67. Mas-Coma, S., Bargues, M. & Valero, M. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int J Parasitol*, **35**:1255-1278.
68. McGarry, J. W., Ortiz, P. L., Hodgkinson, J. E., Goreish, I., Williams, D. J. 2007. PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences. *Ann Trop Med Parasitol*, **101**:415-421.
69. Meites, E., Jay, M. T.; Deresinski, S., Shieh, W. J., Zaki, S. R., Tompkins, L., Smith, D. S. 2004. Reemerging Leptospirosis, California. *Emerg Infect Dis*, **10**:406-412.
70. Mendonça, M. M. 1989. A distribuição geográfica de *Lymnaea truncatula* Muller, 1774 em S. Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Ser Zool*, **16**:65-76.
71. Mendonça, M. M. 1989. Contribuição para o conhecimento de algumas características dos biotopos de *Lymnaea truncatula* Muller, 1774 em S. Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Ser Zool*, **16**:77-89.

72. **Mendonça, M. M. & Barata, M. C.** 1989. Alguns Dados Epidemiológicos relativos à Fasciolose em São Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Ser Zool*, **16**:31-40.
73. **Mendonça, M. M., Barata, M. C., Rombert, P. C., Martins, A. M.** 1996. As primeiras serologias positivas da fasciolose humana em S. Miguel (Açores). *Garcia de Orta, Ser Zool*, **21**:161-164.
74. **Mendonça, M. M., Barata, M. C. & Soares, L.** 1993. A Fasciolose Humana em S. Miguel. *Rev Atla Med*, **15**:33-43.
75. **Merien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Girons, I.** 1992. Polymerase Chain Reaction for Detection of *Leptospira* spp. in Clinical Samples. *J Clin Microbiol*, **30**:2219-2224.
76. **Mgode, G. F., Machang'u, R. S., Collares-Pereira, M., Vieira, M. L., Goris, M. G., Engelbert, M., Hartskeerl, R. A.** 2010. Challenges in determining the pathogenicity status of *Leptospira* isolates with phenotypic methods: The need for a polyvalent approach. *Afr J Microbiol Res*, **4**:2528-2533.
77. **Norbury, L. J.** 2008. Structure, Function and Evolutionary Studies of *Fasciola* Cathepsin L-like Proteases. *Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy, RMIT University, Melbourne, Australia*, 392 pp.
78. **O'Neil, S. M., Parkinson, M., Strauss, W., Rene, A., Dalton, J. P.** 1998. Immunodiagnosis of *Fasciola Hepatica* infection (Fascioliasis) in a Human population in the Bolivian Altiplano using purified Cathepsin L cysteine proteinase. *Am J Trop Med Hyg*, **58**:417-423.
79. **Pappas, G., Papadimitriou, P., Siozopoulou, V., Christou, L., Akritidis, N.** 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int J Infect Dis*, **12**:351-357.
80. **Perez, J. & Goarant, C.** 2010. Rapid *Leptospira* identification by direct sequencing of the diagnostic PCR products in New Caledonia. *BMC Microbiol*, **10**:1-11.

81. **Periago, M. V., Valero, M.A., El Sayed, M., Ashrafi, K., El Wakeel, A., Mohamed, M. Y., Desquesnes, M., Curtale, F., Mas-Coma, S.** 2008. First phenotypic description of *Fasciola hepatica*/*Fasciola gigantica* intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. *Infect Genet Evol*, **8**:51-58.
82. **Picardeau, M., Bulach, D. M., Bouchier, C., Zuerner, R. L., Zidane, N., Wilson, P. J., Creno, S., Kuczek, E. S., Bommezzadri, S., Davis, J. C.; McGrath, A. Johnson M. J., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R. L., Rood J. I., Lajus A., Davies J. K., Médigue C., Adler B.** 2008. Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE*, **3**:1-9.
83. **Pozio, E.** 2008. Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia*, **50**:17-24.
84. **Prasad, P. K., Tandon, V., Biswal, D. K., Goswami, L. M., Chatterjee, A.** 2008. Molecular identification of the Indian liver fluke, *Fasciola* (Trematoda: Fasciolidae) based on the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Parasitol Res*, **103**:1247-1255.
85. **Qureshi, A. W., Tanveer, A., Qureshi, S. W., Maqbool, A., Gill, T. J., Ali, S. A.** 2005. Epidemiology of Human Fasciolosis in rural areas of Lahore, Pakistan. *Punjab Univ J Zool*, **20**:159-168.
86. **Reis, R. B., Ribeiro, G. S., Felzemburgh, R. D., Santana, F. S., Mohr, S., Melendez, A. X., Queiroz, A., Santos, A. C., Ravines, R. R., Tassinari, W. S., Carvalho, M. S., Mitermayer, R. G., Ko, A. I.** 2008. Impact of Environment and Social Gradient on *Leptospira* Infection in Urban Slums. *PLoS Negl Trop Dis*, **2**:1-10.
87. **Rey, L.** 1992. *Bases da Parasitologia Médica*. Brasil: Guanabara Koogan, S. A., 349 pp.
88. **Robinson, M. W. & Dalton, J. P.** 2009. Zoonotic helminth infections with particular emphasis on fasciolosis and other trematodiasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **364**:2763-2776.

89. **Rocha, G. P.** 2011. *Associação Portuguesa de Demografia: Portugal, (des)continuidades demográficas – Uma análise a partir dos Resultados Preliminares dos Censos 2011*. [Online]  
Disponível em: <http://www.apdemografia.pt/ficheiros/1077205322.pdf>  
[Acedido em 19 Maio 2012]
90. **Rokni, M., Baghernejad, A., Mohebbali, M. & Kia, E.** 2004. Enzyme-Linked Immunotransfer Blot Analysis of Somatic and Excretory-Secretory Antigens of *Fasciola hepatica* in Diagnosis of Human Fasciolosis. *Iranian J Publ Health*, **33**:8-13.
91. **Rokni, M. B., Mirhendi, H., Mizani, A., Mohebbali, M., Sharbatkhori, M., Kia, E. B., Abdoli, H., Izadi, S.** 2010. Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-Restriction enzyme method. *Exp Parasitol*, **124**:209-213.
92. **Saba, R. & Korkmaz, M.** 2005. Human Fascioliasis. *Clinical Microbiology Newsletter*, **27**:27-34.
93. **Saba, R., Korkmaz, M., Inan, D., Mamikoğlu, L., Turhan, Ö., Günseren, F., Çevikol, C., Kabaalioğlu, A.** 2004. Human Fascioliasis. *Clin Microbiol Infect*, **10**:385-387.
94. **Sarimehmetoğlu, H. O.** 2002. Application of Western Blotting for the Immunodiagnosis of *Fasciola hepatica* in Cattle Using Excretory/Secretory Antigens. *Turk J Vet Anim Sci*, **26**:1061-1065.
95. **Savioli, L., Chitsulo, L. & Montresor, A.** 1999. New Opportunities for the control of Fascioliasis. *Bull World Health Organ*, **77**:300
96. **Sharma, S., Vijayachari, P., Sugunan, A. P., Natarajaseenivasan, K., Sehgal, S. C.** 2006. Seroprevalence of Leptospirosis among high-risk population of Andaman Islands, India. *Am J Trop Med Hyg*, **74**:278-283.
97. **Sierra, R. M., Agramunt, V. H., Cuervo, P. & Mas-Coma, S.** 2011. Human fascioliasis in Argentina: retrospective overview, critical analysis and baseline for future research. *Parasit Vectors*, **4**:1-18.

98. **Slack, A.** 2010. Leptospirosis. *Aust Fam Physician*, **39**:495-498.
99. **Slack, A. T., Symonds, M. L., Dohnt, M. F. & Smythe, L. D.** 2006. The epidemiology of leptospirosis and the emergence of *Leptospira borgpetersenii* serovar Arborea in Queensland, Australia, 1998-2004. *Epidemiol Infect*, **134**:1217-1225.
100. **Smits, H. L., Van der Hoorn, M. A., Goris, M. G., Gussenhoven, G. C., Yersin, C., Sasaki, D. M., Terpstra, W. J., Hartskeerl, R. A.** 2000. Simple Latex Agglutination Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis. *J Clin Microbiol*, **38**:1272-1275.
101. **System, I. T. S.** 1996. *ITIS-Report*. [Online]  
Disponível em:  
[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=56135](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=56135)  
[Acedido em 19 Maio 2012]
102. **Tolan, R. W.** 2011. Fascioliasis Due to *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* Infection: An Update on this 'Neglected' Neglected Tropical Disease. *LabMedicine*, **42**:107-116.
103. **Trinca, A. T. & Rombert, P. C.** 1978. Contribuição para o sero-diagnóstico da fasciolíase humana. *O Médico*, 483-485.
104. **Uavechanichkul, R., Sraphet, S., Suwanchaoen, D. & Triwitayakorn, K.** 2011. PCR-Based Technique for Detection and Differentiation of Pathogenic and Saprophytic *Leptospira* Species. *Int J Microbiol Res*, **2**:43-48.
105. **Vado-Solís, I., Cárdenas-Marrufo, M. F., Jiménez-Delgadillo, B., Alzina-López, A., Laviada-Molina, H., Suarez-Solís, V., Zavala-Velázquez, J. E.** 2002. Clinical-Epidemiological study of leptospirosis in humans and reservoirs in Yucatán, México. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, **44**:335-340.



106. Valero, M. A. & Mas-Coma, S. 2000. Comparative infectivity of *Fasciola hepatica* metacercariae from isolates of the main and secondary reservoir animal host species in the Bolivian altiplano high human endemic region. *Folia Parasitol*, **47**:17-22.
107. Vieira, M. L. 2006. Aspectos da caracterização antigénica e molecular da leptospirose em áreas endémicas. *Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa*, Lisboa, 301 pp.
108. Vieira, M. L., Gama-Simões, M. J. & Collares-Pereira, M. 2006. Human leptospirosis in Portugal: a retrospective study of eighteen years. *Int J Infect Dis*, **10**:378-386.
109. Vijayachari, P., Sugunan, A. P. & Shriram, A. N. 2008. Leptospirosis: an emerging global public health problem. *J Biosci*, **33**:557-569.
110. Wang, Z., Jin, L. & Węgrzyn, A. 2007. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories*, **6**:1-10.
111. Wangroongsarb, P., Yaseang, S., Petkanjanapong, W., Naigowit, P., Hagiwara, T., Kawabata, H., Koizumi, N. 2005. Applicability of Polymerase Chain Reaction to Diagnosis of Leptospirosis. *J Trop Med Parasitol*, **28**:43-47.
112. WHO, 2003. Human leptospirosis: Guidance for diagnosis, surveillance and control. *WHO/ILS*, Issue NLM classification: WC 420, Malta, 109 pp. Disponível em:  
[http://www.leptonet.net/assets/images/LeptoGuidelines\\_Print\\_version\\_19May03.pdf](http://www.leptonet.net/assets/images/LeptoGuidelines_Print_version_19May03.pdf)
113. WHO, 2004. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control. *WHO/USEPA/TWA*, 506 pp. Disponível em:  
[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/zoonoses.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/zoonoses.pdf)
114. WHO, 2007. Report of the WHO informal meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. *WHO/CDS/NTD/PCT*, 33 pp. Disponível em:  
[http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/WHO\\_CDS\\_NTD\\_PCT\\_2007.1.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CDS_NTD_PCT_2007.1.pdf)

115. Witmer, G. W., Martins, H. & Flor, L. 2004. Leptospirosis in the Azores: the Rodent Connection. *Wildlife Damage Management, Internet Center for USDA National Wildlife Research Center – Staff Publications*, 217-220.
116. Xue, F., Yan, J. & Picardeau, M. 2009. Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp: lessons learned from the genomes. *Microbes Infect*, **11**:328-333.
117. Yersin, C., Pascal, B., Mérien, F., Wong, T., Panowsky, J., Perolat, P. 1998. Human Leptospirosis in the Seychelles (Indian Ocean): A population-based study. *Am J Med Hyg*, **59**:933-940.
118. Zuerner, R., Haake, D., Ben, A. & Ruud, S. 2000. Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, **2**:455-462.

## **7. ANEXOS 1**

Secretaria Regional dos Assuntos Sociais  
DIRECÇÃO REGIONAL DA SAÚDE

AUTORIDADE DE SAÚDE  
Concelho de \_\_\_\_\_

INQUÉRITO PROSPECTIVO DA LEPTOSPIROSE (IPL)\*

ANO \_\_\_\_\_

CID-10: A27  
Nº Caso  
Nº Ordem

Nome completo				Sexo	1: <input type="checkbox"/> F	2: <input type="checkbox"/> M	Data de	dia mês ano		
Morada				Cód. Postal						
Freguesia	3: <input type="text"/>	Concelho	4: <input type="text"/>	Ilha	5: <input type="text"/>					
Profissão	6: <input type="text"/>	Local de Trabalho (Freguesia)	7: <input type="text"/>	Móvel	8: <input type="text"/>					
Idade	9: <input type="text"/>	Nome do Médico	<input type="text"/>							
Hospital / Serviço	10: <input type="text"/>	Centro de Saúde	11: <input type="text"/>	Outro	12: <input type="text"/>					

OCUPAÇÃO / LAZER		TIPO DE CONTACTO	
Agricultura	13: <input type="text"/>	Peixeiro	18: <input type="text"/>
Agropecuária	14: <input type="text"/>	Jardinação	19: <input type="text"/>
Veterinário	15: <input type="text"/>	Trab. Saneamento	20: <input type="text"/>
Trab. de Matadouro	16: <input type="text"/>	Op. Construção Civil	21: <input type="text"/>
Magarefe	17: <input type="text"/>	Outra:	22: <input type="text"/>
		Laboral	23: <input type="text"/>
		Recreacional	24: <input type="text"/>
		Pele Lesionada	25: <input type="text"/>
		Mordedura	26: <input type="text"/>
		Outro:	27: <input type="text"/>

TRANSMISSÃO PROVÁVEL			
Contacto com Animais		Contacto com Água	
Ratos	28: <input type="text"/>	Água não tratada	34: <input type="text"/>
Bovinos	29: <input type="text"/>	Esgotos	35: <input type="text"/>
Porcos	30: <input type="text"/>	Pesca	36: <input type="text"/>
Cães	31: <input type="text"/>	Desportos em água doce	37: <input type="text"/>
Outro:	32: <input type="text"/>	Outro:	38: <input type="text"/>
Desconhecido	33: <input type="text"/>	Desconhecido	39: <input type="text"/>
Obs.: _____		Viajens Recentes	
		Sim	40: <input type="text"/>
		Não	41: <input type="text"/>
		Especifique (quando e onde):	
		Local provável da contaminação	
		Houve mais pessoas infectadas?	
		Sim	43: <input type="text"/>
		Não	44: <input type="text"/>

QUADRO CLÍNICO		HIPÓTESES DE DIAGNÓSTICO (Inicial)	
Febre	45: <input type="text"/>	Icterícia	55: <input type="text"/>
Calafrios	46: <input type="text"/>	Anemia	65: <input type="text"/>
Cefaleias	47: <input type="text"/>	Leucocitose/Neutrofilia	66: <input type="text"/>
Mialgias	48: <input type="text"/>	Trombocitopenia	67: <input type="text"/>
Odinofagia	49: <input type="text"/>	CK elevado	68: <input type="text"/>
Conjuntivite	50: <input type="text"/>	Tosse	69: <input type="text"/>
Náuseas	51: <input type="text"/>	Dispneia	70: <input type="text"/>
Vómitos	52: <input type="text"/>	Hipoxémia	71: <input type="text"/>
Diarreia	53: <input type="text"/>	Hemoptises	72: <input type="text"/>
Colúria/Bilirrubina	54: <input type="text"/>	Meningismo	73: <input type="text"/>
		Outro:	74: <input type="text"/>
		Leptospirose	75: <input type="text"/>
		S F I	76: <input type="text"/>
		Pneumonia	77: <input type="text"/>
		I R A	78: <input type="text"/>
		Hepatite	79: <input type="text"/>
		ARDS	80: <input type="text"/>
		Meningite	81: <input type="text"/>
		Outro:	82: <input type="text"/>

<b>Data da colheita do material</b> <i>(a preencher pela laboratória)</i>		dia mês ano <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>		Sangue: <input type="text"/>	Líquor: <input type="text"/>	Urina: <input type="text"/>
				Início dos sintomas: <input type="text"/> dia <input type="text"/> mês <input type="text"/> ano		
Antibiótico	Não: <input type="text"/>	Sim: <input type="text"/>	Data de início (antibiótico): <input type="text"/> dia <input type="text"/> mês <input type="text"/> ano		Qual: _____	
Amostras (anteriores)	Não: <input type="text"/>	Sim: <input type="text"/>	Data: <input type="text"/> dia <input type="text"/> mês <input type="text"/> ano		Nº Lab. (U L B L): <input type="text"/>	
			Data: <input type="text"/> dia <input type="text"/> mês <input type="text"/> ano		Nº Lab. (U L B L): <input type="text"/>	
			Data: <input type="text"/> dia <input type="text"/> mês <input type="text"/> ano		Nº Lab. (U L B L): <input type="text"/>	
Obs.: _____						

<b>DIAGNÓSTICO LABORATORIAL</b>								
Serologia / Macro-Aglutinação	<input type="text"/> 92	Não	<input type="text"/> 93	Sim	<input type="text"/> 94	Neg	<input type="text"/> 95	Pos.
Cultura	<input type="text"/> 96	Não	<input type="text"/> 97	Sim	<input type="text"/> 98	Neg	<input type="text"/> 99	Pos.
P C R	<input type="text"/> 100	Não	<input type="text"/> 101	Sim	<input type="text"/> 102	Neg	<input type="text"/> 103	Pos.
<i>(A preencher pela ULBL)</i>								
Serologia / Micro-Aglutinação	<input type="text"/> 104	Neg	<input type="text"/> 105	NC	<input type="text"/> 106	Pos		
					Co-aglut:	<input type="text"/> 107	Título:	<input type="text"/> 108
					Sorograde:	<input type="text"/> 109	Título:	<input type="text"/> 110

**SEGUIMENTO DO DOENTE**

Data do internamento	dia mês ano	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Data da alta	dia mês ano	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Morte	<input type="text"/> 111	Causa	<input type="text"/>	dia mês ano	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Diagnóstico de alta	Leptospirose	<input type="text"/> 112	Sim	<input type="text"/> 113	Não	Outro:	<input type="text"/> 114	_____									
Diagnóstico final	Leptospirose	<input type="text"/> 115	Sim	<input type="text"/> 116	Não	Outro:	<input type="text"/> 117	_____									
Outras Obs.: _____																	

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

O Médico

O material deve ser enviado para:  
 Unidade de Leptospirose e Borreliose de Lyme  
 Instituto de Higiene e Medicina Tropical  
 R. da Junqueira, 96 - 1349-008 Lisboa  
 Fax. 21 363 2105 Tel. 21 365 2600/40

**Figura II 7.1.** Inquérito epidemiológico existente na ilha de São Miguel para a análise da Leptospirose (adaptado de: Collares-Perreira, et al., 2009 <sup>(23)</sup>)